

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ
ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ ΚΑΙ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ
“ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑ ΚΑΙ ΠΟΙΟΤΗΤΑ ΔΙΑΤΡΟΦΗΣ ΚΑΙ ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝΤΟΣ”

ΖΑΜΠΑΚΑΣ ΚΩΝΣΤΑΝΤΙΝΟΣ

ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΑΝΑΓΩΓΙΚΗΣ ΙΚΑΝΟΤΗΤΑΣ ΚΑΙ ΑΝΤΙΟΞΕΙΔΩΤΙΚΗΣ
ΔΡΑΣΗΣ IN VITRO ΣΕ ΕΝΘΥΛΑΚΩΜΕΝΑ ΠΟΛΥΦΑΙΝΟΛΙΚΑ
ΕΚΧΥΛΙΣΜΑΤΑ ΑΠΟ ΑΠΟΒΛΗΤΑ ΕΛΑΙΟΤΡΙΒΕΙΟΥ.

ΛΑΡΙΣΑ 2014

**ASSESSMENT IN VITRO OF REDUCING POWER AND ANTIOXIDANT
ACTIVITY OF ENCAPSULATED POLYPHENOLIC EXTRACTS FROM OLIVE
MILL WASTE WATER**

**ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΑΝΑΓΩΓΙΚΗΣ ΙΚΑΝΟΤΗΤΑΣ ΚΑΙ ΑΝΤΙΟΞΕΙΔΩΤΙΚΗΣ
ΔΡΑΣΗΣ IN VITRO ΣΕ ΕΝΘΥΛΑΚΩΜΕΝΑ ΠΟΛΥΦΑΙΝΟΛΙΚΑ
ΕΚΧΥΛΙΣΜΑΤΑ ΑΠΟ ΑΠΟΒΛΗΤΑ ΕΛΑΙΟΤΡΙΒΕΙΟΥ.**

© 2014 ΚΩΝΣΤΑΝΤΙΝΟΣ ΖΑΜΠΙΑΚΑΣ

Η έγκριση της μεταπτυχιακής εργασίας, από το Τμήμα Βιοχημείας & Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας, δεν υποδηλώνει αποδοχή των απόψεων του συγγραφέα (Ν. 5343/32 αρ. 202 παρ. 2).

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

Δημήτριος Στάγκος (επιβλέπων): Λέκτορας Φυσιολογίας Ζωικών Οργανισμών του Τμήματος Βιοχημείας & Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας

Δημήτριος Κουρέτας: Καθηγητής Φυσιολογίας Ζωικών Οργανισμών του Τμήματος Βιοχημείας & Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας

Κων/νος Πετρωτός: Επίκουρος Καθηγητής του Τμήματος Μηχανικής Βιοσυστημάτων του ΤΕΙ/Λάρισας

Στην Ευαγγελία,
που με ανέχεται στωικά όλα αυτά
τα χρόνια .

Ευχαριστίες

Η παρούσα εργασία εκπονήθηκε στο εργαστήριο Φυσιολογίας Ζωικών Οργανισμών υπό την επίβλεψη του Καθηγητή κ. Δημήτρη Κουρετα τον οποίο θα ήθελα να τον ευχαριστήσω που μου έδωσε την δυνατότητα να φέρω εις πέρας την μεταπτυχιακή μου διατριβή καθώς και τις συμβουλές του, την υπομονή του και την συμπαράσταση του σε αυτό μου το εγχείρημα.

Ευχαριστώ επίσης τον Λέκτορα κ. Δημήτρη Σταγκο για την υποστήριξη του και την πολύτιμη βοήθεια του τόσο στο εργαστηριακό όσο και στο συγγραφικό κομμάτι της παρούσης μεταπτυχιακής εργασίας.

Θα ήθελα να ευχαριστήσω όλο το προσωπικό του εργαστηρίου αλλά ιδιαίτερα την Ευθαλία Κερασιώτη και τον Αναστάσιο Μπεσιο για τις πολύτιμες συμβουλές τόσο στο εργαστηριακό κομμάτι όσο και στο συγγραφικό.

Τέλος θα ήθελα να ευχαριστήσω την οικογένεια μου γιατί χωρίς την συνεχή και ουσιαστική στήριξη τόσο οικονομική αλλά περισσότερο ηθική δεν θα είχα την δυνατότητα να ούτε να ξεκινήσω αλλά ούτε και να καταφέρω τελικά να πάρω τις γνώσεις και τις εμπειρίες που συνέλεξα μέσα από το μεταπτυχιακό αυτό.

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Τα τελευταία χρόνια υπάρχει μεγάλο ερευνητικό ενδιαφέρον για τις αντιοξειδωτικές ουσίες (π.χ. πολυφαινόλες) οι οποίες είναι ικανές να βοηθήσουν τον ανθρώπινο οργανισμό να αντιμετωπίζει ασθένειες όπως ο καρκίνος, διαφορές καρδιαγγειακές παθήσεις και νευροεκφυλιστικές νόσους.

Στόχος αυτής της διατριβής είναι ο προσδιορισμός τόσο της αντιοξειδωτικής δράσης όσο και της αναγωγικής ικανότητας που έχουν πολυφαινολικά εκχυλίσματα που απομονώθηκαν από απόβλητα ελαιοτριβείου και τα οποία ενθυλακώθηκαν σε πρωτεΐνη τυρογάλακτος, μαλτοδεξτρίνη και ζελατίνη. Για τον λόγο αυτό χρησιμοποιήθηκαν δυο μέθοδοι η πρώτη στηρίζεται στην εξουδετέρωση της ρίζας DPPH και η δεύτερη μέθοδος στηρίζεται στην αναγωγή ιόντων σιδήρου.

Με το πέρας των πειραμάτων μπορούμε να βγάλουμε κάποια ασφαλή συμπεράσματα τόσο για την χρήση όσο και για την ικανότητα των εξεταζόμενων δειγμάτων. Και στις δύο μεθόδους περισσότερο δραστικά ήταν τα δείγματα που ενθυλακώθηκαν σε πρωτεΐνη, μετά τα δείγματα που ενθυλακώθηκαν σε μαλτοδεξτρίνη και λιγότερο ισχυρά τα δείγματα που ενθυλακώθηκαν σε ζελατίνη.

Συμπερασματικά τα αποτελέσματα της παρούσας μελέτης δείχνουν ότι η ενθυλάκωση πολυφαινολικών εκχυλισμάτων κυρίως σε πρωτεΐνη αλλά και μαλτοδεξτρίνη έχει ως αποτέλεσμα να διατηρούν μια ισχυρή αντιοξειδωτική αλλά και αναγωγική δραστηριότητα και άρα μπορούν να χρησιμοποιηθούν είτε ως διατροφικά συμπληρώματα είτε για την παρασκευή βιολειτουργικών τροφίμων. Η ενθυλάκωση πολυφαινολικών εκχυλισμάτων προσφέρει το πλεονέκτημα ότι έτσι αυξάνεται η βιοδιαθεσιμότητα τους από τον ανθρώπινο οργανισμό και επομένως ενισχύεται η δραστηριότητά τους και οι ευεργετικές τους επιδράσεις στην ανθρώπινη υγεία. Επίσης, τα απόβλητα ελαιοτριβείων δημιουργούν σοβαρά περιβαλλοντικά προβλήματα που οφείλονται σε μεγάλο βαθμό και στις πολυφαινόλες που περιέχουν. Έτσι, η απομόνωση και η αξιοποίηση των πολυφαινολών από τα απόβλητα ελαιοτριβείων από τη μια μειώνει το ρυπαντικό φορτίο αυτών των αποβλήτων και από την άλλη μπορεί να οδηγήσει στην ανάπτυξη χρήσιμων προϊόντων με επιστημονικό αλλά και οικονομικό ενδιαφέρον.

ABSTRACT

In the last years, there is a growing research interest for antioxidant compounds (e.g. plant polyphenols) which may prevent diseases such as cancer, cardiovascular and neurodegenerative diseases.

The aim of the present study was the assessment of the antioxidant activity and the reducing power of polyphenolic extracts from olive mill waste waters that were encapsulated into whey protein, maltodextrine and zelatin. For this aim, two in vitro methods were used, the DPPH assay and the reducing power assay.

The results showed that the most potent samples were those that were encapsulated in whey protein, the second most potent were those encapsulated in maltodextrine and the less potent were those encapsulated in zelatin.

In conclusion, the results of the present study demonstrate that the encapsulation of polyphenolic extracts from olive mill waste waters mainly in whey protein but also in mantodextrine results in strong antioxidant and reducing power, and consequently they may be used as antioxidant food supplements or for the development of biofunctional foods. The encapsulation of the polyphenolic extracts provides the advantage that it increases the bioavailability of the extracts, and in turn it increases their bioactivity and beneficial effects on human health. Moreover, the olive mill waste waters cause serious environmental problems attributed to a great extent to their polyphenolic content. Thus, the isolation and the exploitation of polyphenols from olive mill waste waters would reduce the pollutant loading and may lead to the development of valuable products with scientific and economic interest.

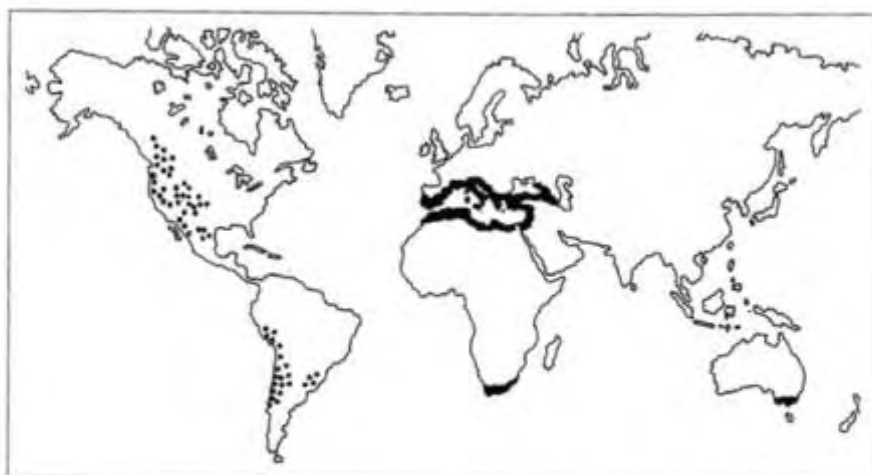
ΠΕΡΙΛΗΨΗ.....	7
ABSTRACT.....	8
ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ.....	9
1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ.....	11
1.1. ΒΟΤΑΝΟΛΟΓΙΚΑ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ.	13
1.2 ΠΑΡΑΓΩΓΗ ΤΗΣ ΕΛΙΑΣ.....	15
1.3 ΠΟΙΟΤΙΚΗ ΚΑΤΑΤΑΞΗ ΕΛΑΙΟΛΑΔΟΥ.....	16
2 ΑΠΟΒΛΗΤΑ ΕΛΙΑΣ ΚΑΙ ΕΠΕΞΕΡΓΑΣΙΑ.....	19
2.1 ΕΙΣΑΓΩΓΗ.....	19
2.2 ΠΟΣΟΤΗΤΕΣ ΑΠΟΒΛΗΤΩΝ.....	20
2.3 ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ ΑΠΟΒΛΗΤΩΝ.....	21
2.3.1 ΡΥΠΑΝΤΙΚΟ ΦΟΡΤΙΟ.....	21
2.3.2 ΦΥΣΙΚΟΧΗΜΙΚΕΣ ΙΔΙΟΤΗΤΕΣ.....	23
3. ΜΕΘΟΔΟΙ ΔΙΑΧΕΙΡΙΣΗΣ ΥΓΡΩΝ ΑΠΟΒΛΗΤΩΝ.....	28
3.1 ΣΥΣΤΑΣΗ ΑΠΟΒΛΗΤΩΝ ΕΛΑΙΟΥΡΓΕΙΩΝ.....	28
3.2 ΜΕΘΟΔΟΙ ΔΙΑΧΕΙΡΙΣΗΣ (ΥΑΕ).....	29
3.2.1. ΑΕΡΟΒΙΑ ΒΙΟΛΟΓΙΚΗ ΕΠΕΞΕΡΓΑΣΙΑ.....	29
3.2.2. ΑΕΡΟΒΙΑ ΕΠΕΞΕΡΓΑΣΙΑ ΤΩΝ ΑΠΟΒΛΗΤΩΝ ΕΛΑΙΟΥΡΓΕΙΩΝ ΓΙΑ ΠΑΡΑΓΩΓΗ ΜΙΚΡΟΒΙΑΚΗΣ ΒΙΟΜΑΖΑΣ ΚΑΙ ΜΙΚΡΟΒΙΑΚΩΝ ΜΕΤΑΒΟΛΙΤΩΝ.....	33
4. ΠΟΛΥΦΑΙΝΟΛΕΣ ΚΑΙ ΑΠΟΒΛΗΤΑ ΕΛΑΙΟΥΡΓΕΙΩΝ.....	37
4.1 ΠΟΛΥΦΑΙΝΟΛΕΣ.....	37
4.1.1. ΦΥΣΙΚΕΣ ΙΔΙΟΤΗΤΕΣ ΠΟΛΥΦΑΙΝΟΛΩΝ.....	38
4.1.2. ΚΑΤΗΓΟΡΙΕΣ ΦΥΤΙΚΩΝ ΠΟΛΥΦΑΙΝΟΛΩΝ.....	38
4.1.3. ΠΟΛΥΦΑΙΝΟΛΕΣ ΣΤΗΝ ΕΠΙΤΡΑΠΕΖΙΑ ΕΛΙΑ.....	40
4.1.4. ΠΟΛΥΦΑΙΝΟΛΕΣ ΥΥΓΡΩΝ ΑΠΟΒΛΗΤΩΝ ΕΛΑΙΟΥΡΓΕΙΩΝ.....	44
4.1.5. ΜΕΘΟΔΟΙ ΕΞΑΓΩΓΗΣ ΦΑΙΝΟΛΙΚΩΝ ΕΝΩΣΕΩΝ.....	47
5. ΕΛΕΥΘΕΡΕΣ ΡΙΖΕΣ.....	48
5.1 ΠΩΣ ΔΗΜΙΟΥΡΓΟΥΝΤΑΙ ΟΙ ΕΛΕΥΘΕΡΕΣ ΡΙΖΕΣ ΣΤΟΝ ΟΡΓΑΝΙΣΜΟ.....	49
5.2 ΠΩΣ ΕΞΟΥΔΕΤΕΡΟΝΟΝΤΑΙ ΤΑ ΔΕΟ ΣΤΟΝ ΟΡΓΑΝΙΣΜΟ ΜΑΣ.....	51
5.3 ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΤΩΝ ΔΕΟ ΣΤΗΝ ΥΓΕΙΑ.....	52
6. ΣΚΟΠΟΣ.....	53
7. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ.....	54

7.1	ΕΚΧΥΛΙΣΜΑΤΑ.....	54
7.1.2	ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΑ.....	58
7.1.3	ΕΚΤΙΜΗΣΗ ΤΗΣ ΑΝΤΙΟΞΕΙΔΩΤΙΚΗΣ ΙΚΑΝΟΤΗΤΑΣ ΜΕΣΩ ΑΛΛΗΛΕΠΙΔΡΑΣΗΣ ΜΕ ΤΗΝ ΡΙΖΑ DPPH	58
7.1.4	ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΗ ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ	59
7.2	ΕΚΤΙΜΗΣΗ ΤΗΣ ΑΝΑΓΩΓΙΚΗΣ ΙΚΑΝΟΤΗΤΑΣ.....	61
8.	ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ	63
8.1	ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΜΕΘΟΔΟΥ DPPH.....	63
8.2	ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΑΝΑΓΩΓΙΚΗΣ ΔΥΝΑΜΗΣ	76
9	ΣΥΖΗΤΗΣΗ.....	90
10	ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....	93

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Η προέλευση της ελιάς χάνεται στα βάθη του χρόνου. Οι πρώτες καλλιέργειές της, τοποθετούνται στο 6000 πχ στην περιοχή της Συρίας. Στη συνέχεια μέσω των εμπορικών δρόμων της εποχής, το ελαιόδεντρο και οι τεχνικές καλλιέργειας και αναπαραγωγής της εξαπλώθηκαν στην Κύπρο, την Ελλάδα και τη νότιο Αφρική. Ήδη από το 1500 π.χ. το ελαιόλαδο αποτελούσε κύριο προϊόν εμπορίου των Κρητών. Οι αρχαίοι Έλληνες θεωρούσαν την ελιά ως σύμβολο ευφορίας, νίκης και ειρήνης. Ο χαρακτήρας της ελιάς ως σύμβολο καθώς του ελαιολάδου πέρασε και στη θρησκεία και παράδοση των χριστιανών, η οποία διατηρήθηκε μέχρι και σήμερα. Το ελαιόλαδο είχε αναγνωριστεί για την ιδιαίτερη συνεισφορά του σε θέματα υγείας και ο Ιπποκράτης το είχε ανακηρύξει ως «το μέγα φάρμακο». Σήμερα εμπειριστατωμένες έρευνες και μελέτες έχουν αναδείξει το ελαιόλαδο σαν ένα από τα σημαντικότερα προϊόντα υγιεινής διατροφής. Θεωρείται ότι μειώνει τα καρδιακά νοσήματα και τη χοληστερόλη και έχει χημειοπροστατευτική δράση, ενώ οι πολυφαιφικός του ελαιολάδου ως φυσικά αντιοξειδωτικά επιδρούν ευεργετικά στην πρόληψη ή και θεραπεία πολλών άλλων νοσημάτων (Visioli & Galli 1998, Owen et al. 2000). Πρόσφατα, και άλλα συστατικά του ελαιολάδου αποδείχθηκε ότι έχουν προστατευτική δράση έναντι της in vitro οξείδωσης της LDL χοληστερόλης (Andrikopoulos et al. 2002).

Η βιομηχανία εκμετάλλευσης του ελαιολάδου αποτελεί μια από τις σημαντικότερες βιοτεχνίες τροφίμων στη χώρα μας. Υπάρχουν πάνω από 686.000 καλλιεργητές της ελιάς (οι οποίοι αντιπροσωπεύουν το 6,5% του συνολικού ποσοστού) και οι οποίοι φροντίζουν 137 εκατοστάρια ελαιόδεντρα. Οι καλλιεργούμενες εκτάσεις στη χώρα μας αποτελούν το 18,5% της συνολικής γεωργικής γης και οι οποίες δίνουν μια παραγωγή περίπου 2 εκατομμύρια τόνων ελιάς ετησίως.



Γεωγραφική κατανομή της καλλιέργειας της ελιάς στον κόσμο



Η καλλιέργεια της ελιάς στην Ελλάδα

Εικόνα 1 - Η γεωγραφική κατανομή της ελιάς σε παγκόσμιο επίπεδο και η καλλιέργεια της στην Ελλάδα.

1.1. ΒΟΤΑΝΟΛΟΓΙΚΑ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ

Το είδος *Olea europaea* (Ευρωπαϊκή) ανήκει στο γένος *Olea* της οικογένειας των Ελαιϊδών (*Oleaceae*). Το γένος αυτό περιλαμβάνει περίπου 40 είδη αιθαλών θάμνων και δέντρων. Είναι δέντρο αιωνόβιο, χάρη στην ανθεκτικότητα και την ικανότητά του να δημιουργεί βλαστούς από οφθαλμούς του κάτω μέρους του κορμού του. Συναντάται σε περιοχές κυρίως ξηρές και ημίξηρες και ευδοκimeί ιδιαίτερα στις χώρες της Μεσογείου, όπου οι συχνές βροχοπτώσεις από το φθινόπωρο μέχρι την άνοιξη το βοηθούν στην γρήγορη ανάπτυξη. Στην Ελλάδα ο μεγάλος αριθμός ποικιλιών οφείλεται στο γεγονός ότι πολλές από αυτές χρησιμοποιούνται για ελαιοποίηση και άλλες για επιτραπέζια κατανάλωση. Για επιτραπέζια κατανάλωση οι συνήθεις είναι Κονσερβοελιά, Καλαμών, Χαλκιδικής και Θρουμποελιά, ενώ για ελαιοποίηση Κορωνέικη, Λιανοελιά, Λαδοελιά, Τσουνάτη, Αγουρομάνακο, Μεγαρείτικη, Βαλανολιά, Ματολιά και Κοθρέικη (Μπαλατσούρας, 1984).

Οι σημαντικότερες ξένες ποικιλίες επιτραπέζιων ελιών είναι οι ποικιλίες *Sevillian Gordal*, *Manzanilla*, *Hojiblanca* και *Verdial*, οι οποίες καλλιεργούνται κυρίως στην Ισπανία, οι *Ascolana* και *Grossa di Spagna*, που δίνουν τις πράσινες ελιές στην Ιταλία, οι *Phicoline* και *Tanche* στην Γαλλία, η *Domat* για πράσινες ελιές και η *Gemlik* για μαύρες ελιές στην γειτονική Τουρκία. Ο καρπός του δέντρου *Olea europaea* είναι δρύπη με μεγαλύτερο μήκος από την κεντρική διάμετρό του. Ο λόγος μεταξύ διαμέτρου και μήκους εξαρτάται από την κάθε ποικιλία. Οι καρποί αρχικά είναι πράσινοι, αλλά με την ωρίμανση το χρώμα της επιφάνειας γίνεται ροζ, κόκκινο ή μαύρο. Το βάρος κατά μέσο όρο των ελαιόκαρπων ποικίλει από 1,5 έως 12 g, το μέσο μήκος μεταξύ 1 και 3 cm και η εγκάρσια διάμετρος από 1 έως 2 cm. Ο καρπός αποτελείται από τον πυρήνα (περικάρπιο) και το κουκούτσι (ενδοκάρπιο). Το περικάρπιο αποτελείται από το επικάρπιο (φλούδα) και το μεσοκάρπιο (σάρκα, πούλπα) που είναι και το 65-83% του συνολικού βάρους. Το ενδοκάρπιο, το οποίο περιέχει το ενδοσπέρμιο, αντιστοιχεί στο 13-30% του βάρους (Boskou, 1996). Η μέση χημική σύσταση των καρπών της ελιάς είναι: νερό (50-70%), πρωτεΐνες (1,5-3%), έλαιο (22%), υδατάνθρακες (19%), κυτταρίνη (6%), ανόργανα (τέφρα 1,5%) (Fedeli, 1997 & Kritsakis, 1990). Σημαντικά συστατικά των ελαιόκαρπων είναι πηκτίνες, οργανικά οξέα, χρωστικές (χλωροφύλλες, καροτενοειδή και ανθοκυάνες) και γλυκοζίδια των φαινολών. (Loussert et al., 1978 & Boskou 1996). Στους ελαιόκαρπους έχουν ανιχνευθεί επίσης και ένζυμα, όπως κυτταρινάσες (Heredia Moreno et al. 1984), χλωροφυλλάσες (Minguez-Mosquera et al. 1994), πολυγαλακτουρονάση και πηκτινестεράση (Castillo Gomez et al. 1978 & Minguez-Mosquera, 1982), όπως και λιπάση, λιποξυγονάση, φαινολοξειδάση και υπεροξειδάση.

Η ωρίμανση των καρπών είναι μια μακρόχρονη και αργή διαδικασία που διαρκεί πολλούς μήνες και παρουσιάζει διαφοροποιήσεις ανάλογα με το

γεωγραφικό πλάτος της καλλιεργήσιμης περιοχής, την ποικιλία, την ηλικία και κατάσταση υγείας του ελαιόδεντρου, τη διαθεσιμότητα του νερού, τη θερμοκρασία, το φως, τη μέθοδο της καλλιέργειας και τη χρήση λιπασμάτων (Kiritsakis, 1990 & Boskou, 1996). Η ωρίμανση είναι γρήγορη στο πρώτο της στάδιο, πιο αργή κατά το δεύτερο στάδιο τον Αύγουστο και Σεπτέμβριο, και ξανά πολύ γρήγορη στο τρίτο στάδιο που συμπίπτει με τη μεταβολή του χρώματος από πράσινο προς κίτρινο, κόκκινο και μαύρο (Kiritsakis, 1990). Ο καρπός παίρνει βάρος μέχρι τον Οκτώβριο-Νοέμβριο και στη συνέχεια μειώνεται λόγω πτώσης της υγρασίας του. Το περιεχόμενο έσσι του καρπού σε έλαιο, αυξάνεται περισσότερο από τον Οκτώβριο μέχρι το Δεκέμβριο. Στη διάρκεια του φθινοπώρου και του χειμώνα ο καρπός μαυρίζει και η περιεκτικότητα σε έλαιο αυξάνεται μέχρι να φτάσει το μέγιστό της σημείο. Το έλαιο συγκεντρώνεται κυρίως στο περικάρπιο (96-98%) (Boskou, 1996). Γενικά, οι καρποί των φρούτων έχουν μικρή περιεκτικότητα σε λιπαρές ουσίες. Αντίθετα, ο καρπός της ελιάς χαρακτηρίζεται από υψηλή περιεκτικότητα σε λιπαρά, η οποία αυξάνεται όσο προχωρά η ωρίμανση.

Κατά συνέπεια λοιπόν οι ώριμοι καρποί περιέχουν πάντα περισσότερα λιπαρά από τους άγουρους (πράσινους). Η σύνθεση των λιπαρών αλλάζει επίσης με την ωρίμανση. Το ποσοστό του παλμιτικού, λινελαϊκού και λινολενικού οξέος μειώνεται με την πάροδο της ωρίμανσης, ενώ τα επίπεδα του στεατικού και κυρίως του ελαϊκού οξέος μεγαλώνουν κατά τη διάρκεια αυτής της περιόδου. Η συγκέντρωση των σακχάρων στις ελιές είναι επίσης χαμηλότερη συγκριτικά με τα περισσότερα φρούτα και μειώνεται καθώς προχωρά η διαδικασία της ωρίμανσης. Η μείωση των σακχάρων είναι μείζονος σημασίας για τη διαδικασία ζύμωσης για όλες τις επεξεργασίες των επιτραπέζιων ελιών, γιατί είναι η κύρια πηγή άνθρακα για τη μικροβιακή ανάπτυξη. Πράγματι, η μικροβιακή ανάπτυξη σε πράσινες ελιές που έχουν δεχθεί χειρισμούς με καυστικό νάτριο είναι δύσκολη λόγω έλλειψης ικανοποιητικών ζυμώσιμων συστατικών. Εντούτοις, αυτή η περίπτωση δεν έχει σημασία στην επίδραση στις φυσικές μαύρες ελιές. Στον ελαιόκαρπο βρίσκεται επίσης η μανιτόλη αλλά χρησιμοποιείται πολύ δύσκολα από τους μικροοργανισμούς. Οι νωπές ελιές έχουν ακόμα μια χαρακτηριστική συγκέντρωση σε διαιτητικές ίνες, περισσότερη κυτταρίνη, ημικυτταρίνη και λιγνίνη. Οι ουσίες κυμαίνονται από 0,3 ως 0,6%. Η περιεκτικότητα των νωπών καρπών σε ιχνοστοιχεία είναι χαμηλή με το κάλιο να είναι το αφθονότερο στοιχείο στην τέφρα του καρπού. Επίσης, ο ελαιόκαρπος περιέχει σημαντικό ποσοστό φαινολικών ενώσεων που κυμαίνονται από 3 ως 6% επί της ξηράς ουσίας. Το πράσινο χρώμα που παρουσιάζει στην αρχή ο καρπός οφείλεται στην παρουσία χλωροφύλλης και το ρόδινο έως πορφυρό χρώμα των ώριμων ελιών στο σχηματισμό των ανθοκυανών. Οι πράσινοι καρποί είναι επίσης αρκετά πλούσιοι σε καροτενοειδή τα οποία δίνουν κιτρινωπό χρώμα στην επιδερμίδα.

Τέλος, οι νωπές ελιές περιέχουν μεγάλα ποσά οργανικών οξέων (μηλικό, οξαλικό, κιτρικό, κλπ). Σε αντίθεση με άλλους καρπούς, οι ελιές δεν γίνεται να

καταναλωθούν χωρίς επεξεργασία λόγω της παρουσίας της ελευρωπαΐνης. Η συγκέντρωση αυτής της ένωσης πέφτει με το χρόνο ωρίμανσης. Στην πραγματικότητα οι πλήρως ώριμες ελιές ορισμένων ποικιλιών παρουσιάζουν μικρή συγκέντρωση ελευρωπαΐνης και μπορούν να καταναλωθούν άμεσα. Μια τέτοια περίπτωση είναι η ποικιλία Θρουμπολιά, ο καρπός της οποίας αποτελεί πρώτη ύλη για την παραγωγή ελιάς ξηράλατου τύπου. Για τον λόγο αυτό, οι ιστορικοί πιστεύουν ότι οι ώριμοι καρποί αυτών των ποικιλιών ήταν οι πρώτοι που χρησιμοποιήθηκαν ως τρόφιμα, όπως ήταν, αλατισμένοι ή με διάφορα αρωματικά φυτά. Εντούτοις, η σύγχρονη επεξεργασία της ελιάς έχει ως σκοπό να μειώσει αυτήν την φυσική πικρή γεύση όσο το δυνατόν περισσότερο.

1.2 Η ΠΑΡΑΓΩΓΗ ΤΗΣ ΕΛΙΑΣ

Η παραγωγή της ελιάς εντοπίζεται κυρίως στις ακόλουθες χώρες της Ευρώπης: Ισπανία, Πορτογαλία, Ιταλία, Ελλάδα, Τουρκία, Τυνησία και Μαρόκο. Αυτές οι επτά χώρες παράγουν το 90% της παγκόσμιας παραγωγής. Η παγκόσμια παραγωγή αυξάνεται κατά μέσο όρο 11% ανά έτος από το 1995. Οι διακυμάνσεις στην παραγωγή είναι ένα κύριο χαρακτηριστικό γνώρισμα της ελαιοκαλλιέργειας, που συνδέεται άμεσα με τις μεταβολές του κλίματος (π.χ. ξηρασία στην Ισπανία το 1995/96 και παγετός στην Ελλάδα το 2001/02), καθώς επίσης με το φαινόμενο της παρενδιαυτοφορίας, ένα χαρακτηριστικό του ελαιόδενδρου όπου η παραγωγή του επομένου έτους είναι μικρότερη από εκείνη του προηγούμενου. Παρόλα αυτά, τα ποσοστά παραγωγής αυξάνονται και το Διεθνές Συμβούλιο Ελαιολάδου έχει προτείνει να μειωθεί το ποσοστό των νέων καλλιεργούμενων εκτάσεων μετά το έτος 2005, γιατί εκτιμάται ότι θα υπάρξει παγκόσμιο πλεόνασμα ελαιολάδου. Η αυξανόμενη παραγωγή επιφέρει επίσης μεγάλη ποικιλία εμπορικών τύπων επιτραπέζιων ελιών (ολόκληρες, εκपुरηνωμένες, τεμαχισμένες, γεμιστές, κλπ). Με μέσο ετήσιο ποσοστό αύξησης που ξεπερνά το 4%, οι επιτραπέζιες ελιές και το ελαιόλαδο αποτελούν έναν από τους ταχύτερα αναπτυσσόμενους αγροτο-διατροφικούς κλάδους στην Ευρώπη και κατ' επέκταση στον υπόλοιπο κόσμο. Σε ολόένα και περισσότερες χώρες το ελαιόλαδο έχει γίνει μέρος της καθημερινής διατροφής. Περισσότεροι από 11.000.000 τόνοι ελιών καλλιεργούνται ετησίως στα κράτη-μέλη της ΕΕ, από τις οποίες παράγονται πάνω από 2.000.000 τόνοι ελαιολάδου σε περίπου 12.000 ελαιοτριβεία. Η βιομηχανία ελαιολάδου είναι μείζονος σπουδαιότητας για την οικονομία της Ευρωπαϊκής Ένωσης και αποτελεί έναν από τους μεγαλύτερους τομείς μεταποίησης, ο οποίος παρέχει εργασία σε 800.000 ανθρώπους. Επίσης, ποσοστό 90% των επιχειρήσεων που δραστηριοποιούνται στο χώρο είναι μικρές ή μεσαίου μεγέθους επιχειρήσεις (Working paper of the Directorate-General for Agriculture: The olive oil and table olives sector).

Στην περίπτωση της επιτραπέζιας ελιάς, η Ευρωπαϊκή Ένωση είναι και πάλι ο μεγαλύτερος παραγωγός διεθνώς (40-45%), με ποσότητες που κατά την τελευταία παραγωγική περίοδο φτάνουν μεταξύ 500.000 και 600.000 τόνων, επί συνόλου παγκόσμιας συνολικής παραγωγής 1.300.000 τόνων. Ο τομέας αυτός περιλαμβάνει περίπου 600 επιχειρήσεις εντός της ΕΕ. Από το 1980 μέχρι και σήμερα η έκταση της καλλιέργειας της ελιάς στην Ευρώπη έχει διπλασιαστεί. Με περισσότερα από 4.000.000 εκτάρια είναι ο δεύτερος σημαντικότερος αγροδιατροφικός τομέας που αναπτύσσεται στην Ευρώπη (Working paper of the Directorate-General for Agriculture: The olive oil and table olives sector). Η αύξηση και των δύο κλάδων (ελιά-ελαιόλαδο) έχει μια μονίμως θετική οικονομική ανάπτυξη, καθώς οι μονάδες επεξεργασίας βρίσκονται κυρίως στη λιγότερο αναπτυγμένη περιοχή της νότιας Ευρώπης. Στις μέρες μας οι ελιές παράγονται σε περισσότερες από 40 χώρες σε όλες τις ηπείρους, ακόμη και σε εξωτικές τοποθεσίες όπως η Χαβάη. Όμως το 98% της παγκόσμιας παραγωγής (17,2 εκατομμύρια τόνοι το 2003) συγκομίζονται στην περιοχή της λεκάνης της Μεσογείου.

1.3 ΠΟΙΟΤΙΚΗ ΚΑΤΑΤΑΞΗ ΕΛΑΙΟΛΑΔΟΥ

Οι κατηγορίες ποιότητας ελαιολάδου που ισχύουν σήμερα στην Ελλάδα βασίζονται κυρίως σε εμπορικά κριτήρια, τα οποία καθορίζονται από το Διεθνές Συμβούλιο Ελαιολάδου. Τα κυριότερα ποιοτικά κριτήρια είναι:

- Η οξύτητα
- Ο βαθμός οξείδωσης
- Τα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά (οσμή-γεύση-χρώμα)

Σύμφωνα με τα παραπάνω, το ελαιόλαδο χωρίζεται στις εξής κατηγορίες:

Παρθένο ελαιόλαδο

Είναι το ελαιόλαδο, το οποίο παράγεται αποκλειστικά και μόνο από τους καρπούς της ελιάς, με μηχανικά ή φυσικά μέσα, τα οποία δεν προκαλούν αλλοιώσεις στην τελική ποιότητά του .

Το παρθένο ελαιόλαδο με τη σειρά του περιλαμβάνει τις εξής κατηγορίες:

Παρθένο ελαιόλαδο : Υψηλής ποιότητας Extra. Αυτά τα λάδια είναι τα πιο εκλεκτά. Η οξύτητά τους είναι πολύ χαμηλή, φθάνει μέχρι 1%. Έχουν παραληφθεί από καρπό μόνο με έκθλιψη. Οι ελιές από τις οποίες προέρχονται είναι διαλεγμένες χωρίς κακώσεις. Διακρίνονται από το ότι παρουσιάζουν οργανοληπτικές άριστες ιδιότητες, με χαρακτηριστική φρουτώδη γεύση. Τα λάδια αυτής της κατηγορίας έχουν προέλθει από μηχανική συμπίεση του καρπού χωρίς άλλη κατεργασία, μόνο της πλύσης με νερό και μια εκ των δυο μεθόδων της καθίζησης ή της φυγοκέντρωσης. Το χρώμα τους είναι κίτρινο ή πρασινοκίτρινο.

Παρθένο ελαιόλαδο εκλεκτό Fine : Τα λάδια αυτά έχουν τα ίδια χαρακτηριστικά με το "εξαιρετικό". Η οξύτητά τους είναι το πολύ 1,5%. Έχουν χάσει όμως ορισμένες οργανοληπτικές ιδιότητες, όπως τη φρουτώδη γεύση και το άρωμά τους κατά τη διάρκεια της επεξεργασίας ή την αποθήκευσή τους και γι' αυτό λέγονται εκλεκτά και κατατάσσονται μια βαθμίδα πιο κάτω από τα πρώτης ποιότητας.

Παρθένο ελαιόλαδο Courante ή ημιεκλεκτό : Σε αυτόν τον τύπο ανήκουν τα λάδια που είναι όμοια με τα προηγούμενα με τη διαφορά ότι λόγω ακατάλληλων συνθηκών έχουν οξύτητα 3%. Ανάμειξη ελαιοκάρπων με άλλες ελαττωματικές ελιές (κτυπημένες, προσβεβλημένες από αρρώστιες ή υπερώριμες). Επίσης, να έχουν προκληθεί κάποια σφάλματα στην πορεία της επεξεργασίας, όπως αύξηση θερμοκρασίας, χρονική καθυστέρηση στο διαχωρισμό του λαδιού, κ.α. Συνήθως, τα λάδια αυτού του τύπου προσφέρονται για την ανάμειξη με επεξεργασμένα πυρηνέλαια, ώστε να διορθώνονται οι ελλείψεις τους.

Τα μειονεκτικά ή Λαμ-Παντέ, Lam-Pante : Σ' αυτή την κατηγορία ανήκουν τα λάδια που είναι ελαττωμένης ποιότητας. Έχουν οξύτητα άνω του 3% που φθάνει και 20%, με ενδιάμεσες διαβαθμίσεις (3-5), (5-8), (10-15) και (15-20), καθώς και άλλα ελαττώματα. Δεν είναι βρώσιμα. Για να γίνουν βρώσιμα υποβάλλονται σε ειδική επεξεργασία.

Σύμφωνα με τα παραπάνω, έχουν νομοθετηθεί οι ονομασίες των ελαιολάδων ανάλογα με την ποιότητά τους και με αυτές φαίνονται στο εμπόριο. Οι ονομασίες είναι οι ακόλουθες:

Άλλα είδη ελαιόλαδου.

1. Τα αρωματικά ελαιόλαδα

Σήμερα, μπορούμε σχετικά εύκολα να προμηθευτούμε από την αγορά αλλά και να παρασκευάσουμε μόνοι μας αρωματικά ελαιόλαδα για την κουζίνα μας, αρκεί να εκμεταλλευτούμε τα ελαιόλαδα καλής ποιότητας και με χαμηλούς αρωματικούς τόνους και επίπεδη γεύση και να τα εμπλουτίσουμε με δεκάδες αρωματικά βότανα, μπαχαρικά, ακόμη και φρούτα. Βασικά, υπάρχουν τρεις μεγάλες κατηγορίες αρωματικών ελαιολάδων, τα οποία μπορούμε να παρασκευάσουμε με βότανα, αρωματικά φυτά και μπαχαρικά.

Τα μπαχαρικά: με τα μπαχαρικά μπορούμε να φτιάξουμε αρωματικό ελαιόλαδο όλο το χρόνο. Η ποικιλία που έχουμε είναι πολύ μεγάλη και μπορούμε να τα χρησιμοποιήσουμε ολόκληρα ή σπασμένα: κάρδαμο, κολιάνδρος, καρποί κέδρου, μοσχοκάρυδο, γλυκάνισο, κανέλα, τζίντζερ, πιπέρι, μπαχάρι, μαραθόσπορος. Τα βότανα και τα αρωματικά φυτά: εδώ η ποικιλία είναι ακόμη μεγαλύτερη, μιας και η χώρα μας είναι κατάφυτη με αρωματικά φυτά και βότανα. Η άνοιξη και το καλοκαίρι είναι η καλύτερη εποχή για να τα συλλέξουμε και να φτιάξουμε αρωματικά ελαιόλαδα.

Με λαχανικά: Εδώ η δυνατότητα δεν είναι πολύ μεγάλη, αλλά μπορούμε να δοκιμάσουμε τις κόκκινες καυτερές και γλυκές πιπεριές, τις λιαστές ντομάτες, τα σκόρδα, την άππαρη, τα κινέζικα μανιτάρια και τις τρούφες (Λαμπράκη, 2000).

2. Ελαιόλαδο με φύλλα ελιάς

Είναι γνωστό από χιλιετίες ότι τα φύλλα της ελιάς έχουν υποτασική δράση. Σύμφωνα με έρευνες, η έντονη υποτασική δράση του υγρού εκχυλίσματος των φύλλων της ελιάς συνίσταται στ διαστολή των περιφερειακών αγγείων, χωρίς να καταστέλλεται η καρδιακή λειτουργία. Δρα στις λείες μυϊκές ίνες των αγγείων (Richard Fooks).

Βιολογικό Ελαιόλαδο

Είναι το ελαιόλαδο, το οποίο παράχθηκε από ελιές που καλλιεργούνταν για τουλάχιστον τέσσερα χρόνια με βιολογικές μεθόδους (www.oliveoil.com). Προέρχεται από καλλιέργειες, στις οποίες ο παραγωγός αντιμετωπίζει όλα τα καλλιεργητικά προβλήματα χωρίς χημικές ουσίες, φυτοφάρμακα και λιπάσματα. Εγκεκριμένοι Οργανισμοί Πιστοποίησης ελέγχουν τακτικά τις καλλιέργειες και το τελικό προϊόν (www.gourmet.gr). Τα βιολογικά ελαιόλαδα, όπως και οι άλλες βιολογικές καλλιέργειες κερδίζουν συνεχώς έδαφος στην ελληνική αγορά και κατακτούν τις προτιμήσεις των καταναλωτών. Η ζήτηση των προϊόντων βιολογικής

καλλιέργειας έχει γίνει ιδιαίτερα δημοφιλής. Τα τελευταία χρόνια στη χώρα μας, παρουσιάζοντας αξιοσημείωτη άνοδο. Αρκετοί είναι οι οργανισμοί στην Ελλάδα που πιστοποιούν τα οργανικά γεωργικά προϊόντα. Αναφέρονται ενδεικτικά οι ΒιοΕλλάς, Soye, ΔΗΩ, Dorippe, Φυσιολογική, κ.τ.λ. (ICAP, 2003). Τα βιολογικά ελαιόλαδα όμως είναι ακριβότερα από τα ελαιόλαδα συμβατικής καλλιέργειας.

2. ΑΠΟΒΛΗΤΑ ΕΛΙΑΣ ΚΑΙ ΕΠΕΞΕΡΓΑΣΙΑ

2.1 ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Ο κλάδος της επιτραπέζιας ελιάς και του ελαιολάδου αποτελεί σημαντικό γεωργικό και οικονομικό τομέα στην Ευρώπη. Είναι χαρακτηριστικό ότι ποσοστό άνω του 82% του ελαιολάδου παράγεται από οικογενειακής μορφής επιχειρήσεις στην ευρωπαϊκή περιοχή της Μεσογείου και αντιστοιχεί σε 2.282.650 τόνους ελαιολάδου (περίοδος 2003/2004). Πάνω από 12.000.000 τόνοι ελιών καλλιεργούνται ετησίως στα κράτη-μέλη της ΕΕ., από τις οποίες παράγονται πάνω από 2.000.000 τόνοι ελαιολάδου σε περισσότερα από 12.000 ελαιοτριβεία. Η μεγάλη πλειοψηφία των καρπών (~92%) υποβάλλονται σε επεξεργασία για παραγωγή ελαιόλαδου, ενώ μόλις το 8% προορίζονται για επιτραπέζια χρήση. Στην περίπτωση της επιτραπέζιας ελιάς, η Ευρωπαϊκή Ένωση είναι και πάλι ο μεγαλύτερος παραγωγός διεθνώς (40-45%), με ποσότητες κατά μέσο όρο μεταξύ 500.000 και 600.000 τόνων, επί συνόλου παγκόσμιας συνολικής παραγωγής 1.300.000 τόνων. Βάσει των ποσοτήτων που παράγονται και επεξεργάζονται, προκύπτει ότι η βιομηχανία της ελιάς και του ελαιολάδου είναι υψηλής σημασίας για την οικονομία της Ε.Ε. Αποτελεί κύριο τομέα εργασίας στην βιομηχανία τροφίμων της ΕΕ και προσφέρει εργασία σε 800.000 άτομα εντός της Ε.Ε. Ποσοστό 90% περίπου των μεταποιητικών μονάδων του κλάδου ανήκει στην κατηγορία των μικρών ή μεσαίων επιχειρήσεων. Οι περιοχές στην Ευρώπη όπου καλλιεργούνται ελαιόδεντρα έχουν διπλασιαστεί από το 1980 μέχρι σήμερα και μετρώνται σε 4.000.000 εκτάρια περίπου. Ο ελαιοκομικός κλάδος είναι ο δεύτερος σημαντικότερος αγρο-διατροφικός κλάδος στην Ε.Ε, με μέσο ποσοστό αύξησης ανά έτος μεγαλύτερο από 4%. Το ποσοστό κατανάλωσης αυξήθηκε και αποτελεί σημαντικό μέρος της καθημερινής διατροφής, όχι μόνο στις παραδοσιακές μεσογειακές χώρες, αλλά και σε χώρες στη βόρεια Ευρώπη. Η κατανάλωση αυξήθηκε τα 4 τελευταία έτη πάνω από 35% στην Ευρώπη, και περισσότερο από 15% στις ΗΠΑ.

2.2 ΠΟΣΟΤΗΤΕΣ ΑΠΟΒΛΗΤΩΝ

Ετησίως, τα απόβλητα της επεξεργασίας του ελαιοκάρπου ανέρχονται σε 30 εκατομμύρια m³, εκ των οποίων το 60% είναι υγρά και το 40% στερεά. Η Ισπανία το 2002 παρήγαγε 4.303.700 τόνους ελαιοκάρπου, ο συνολικός όγκος αποβλήτων ήταν περίπου 3,5 εκατομμύρια τόνους (~80% της παραγωγής), από τους οποίους 2,1 εκατομμύρια τόνοι ήταν υγρά απόβλητα και 1,4 εκατομμύρια στερεά. Αναλογικά, μόνο ένας στους 10 ελαιόκαρπους καταναλώνεται ως επιτραπέζια ελιά, ενώ το μεγαλύτερο μέρος επεξεργάζεται για παραγωγή ελαιολάδου ή των παραπροϊόντων του. Η αύξηση της παραγωγής ελαιοκάρπου συμβαδίζει με την αύξηση του όγκου των αποβλήτων και των υποπροϊόντων, προκαλώντας μεγάλη υποβάθμιση του περιβάλλοντος. Ο όγκος και το είδος των αποβλήτων και των υποπροϊόντων εξαρτάται από τον τρόπο που παράγονται, ο οποίος είναι διαφορετικός στην περίπτωση της επιτραπέζιας ελιάς (8% των καλλιεργούμενων ελαιόδενδρων) και του ελαιολάδου (92% των καλλιεργούμενων ελαιόδενδρων). Οι ποσότητες και η σύνθεση των αποβλήτων ποικίλλουν αρκετά και οι παράγοντες που τους επηρεάζουν είναι (Επιτροπή των Ευρωπαϊκών Κοινοτήτων, 1992):

- i) Το είδος της επεξεργασίας
- ii) Την ποικιλία των καρπών
- iii) Το μέγεθος της καλλιεργούμενης έκτασης
- iv) Τη χρήση φυτοφαρμάκων και λιπασμάτων
- v) Το χρόνο συγκομιδής και το στάδιο ωριμότητας
- vi) Το κλίμα και τις καιρικές συνθήκες.

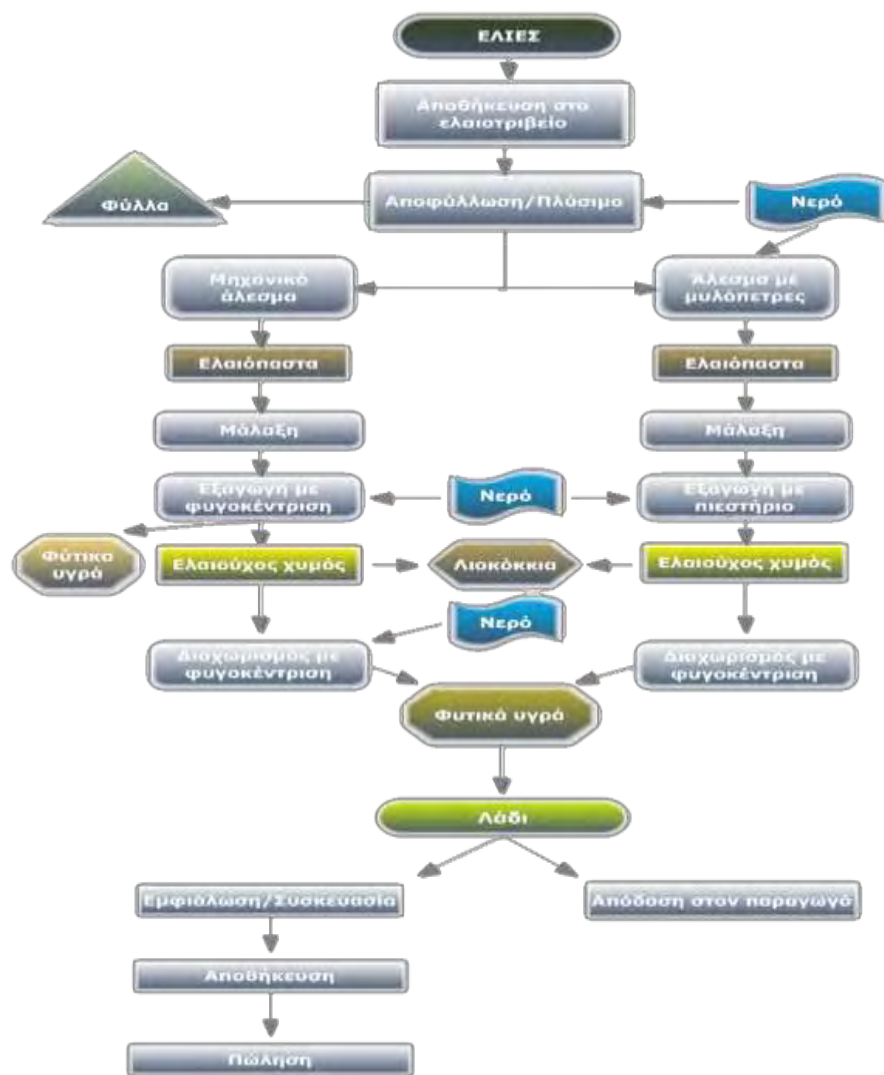
Στις περιοχές που επεξεργάζονται την επιτραπέζια ελιά και το ελαιόλαδο, τα απόβλητα που προέρχονται από την βιομηχανία αντιπροσωπεύουν σχεδόν τα 3/4 της συνολικής παραγωγής αποβλήτων. Αυτό οφείλεται στις μεγάλες ποσότητες νερού που απαιτούνται στα διάφορα στάδια επεξεργασίας του καρπού, καθώς επίσης και για την πλύση του εξοπλισμού της μονάδας, ο οποίος πλένεται μέχρι 3 φορές κάθε μέρα (Mulinacci et al., 2001). Τα απόβλητα περιέχουν τόσο στερεά όσο και υγρά συστατικά. Η αναλογία μεταξύ ελαίου, ύδατος και στερεών συστατικών εξαρτάται πρωτίστως από την πρώτη ύλη, την τεχνολογία επεξεργασίας και τον τύπο του τελικού προϊόντος. Το στάδιο ωρίμανσης επηρεάζει τη σύνθεση του

προϊόντος και των αποβλήτων. Ένας καρπός με βάρος 8,4 g, περιέχει 7 g νερό, 0,57 g έλαιο, 0,47 g υδατάνθρακες, 0,2 g φυτικές ίνες, 0,08 g πρωτεΐνες, 0,083 g ανόργανα άλατα και 0,03 g βιταμίνες. Η περιεκτικότητα σε νερό ελαττώνεται με την ωρίμανση (από πράσινη σε μαύρη ελιά) μέχρι 2 g ενώ αυξάνεται η περιεκτικότητα του ελαίου (Mulinacci et al., 2001). Το νερό του αλεσμένου ελαιοκάρπου περιέχει ανόργανα συστατικά, όπως άζωτο, σίδηρο, κάλιο αλλά και οργανικά συστατικά όπως σάκχαρα, οργανικά οξέα, πηκτίνη και πολυφαινόλες. Όλα αυτά τα συστατικά αυξάνουν το οργανικό φορτίο των αποβλήτων και οι απλές εγκαταστάσεις βιολογικού καθαρισμού δεν μπορούν να απομακρύνουν τα ρυπογόνα αυτά συστατικά από τα υγρά απόβλητα. Τιμές COD 80-200 g/L και BOD5 50-100 g/L δεν είναι σπάνιες σε υγρά απόβλητα από την επεξεργασία του καρπού. Είναι χαρακτηριστικό ότι σε μια μέση μονάδα βιολογικού καθαρισμού αστικών λυμάτων οι τιμές COD και BOD5 βρίσκονται μεταξύ 400 και 800 mg/L. Επιπλέον, το μεγαλύτερο φορτίο των αποβλήτων από την επεξεργασία του ελαιοκάρπου επικεντρώνεται σε μια μικρή χρονική περίοδο κατά τη διάρκεια του έτους (από Νοέμβριο μέχρι Φεβρουάριο).

2.3 ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ ΑΠΟΒΛΗΤΩΝ

2.3.1 ΡΥΠΑΝΤΙΚΟ ΦΟΡΤΙΟ

Τα υγρά απόβλητα ελαιοτριβείων αποτελούν ένα από τα μείζονος σημασίας περιβαλλοντικά προβλήματα κυρίως για τις χώρες της Μεσόγειου, οι οποίες είναι υπεύθυνες για το 95% της παγκόσμιας παραγωγής ελαιολάδου. Στις χώρες αυτές παράγονται 11 εκατομμύρια τόνοι ελιάς ετησίως από τις οποίες εξάγονται 1,7 εκατομμύρια τόνοι ελαιολάδου. Εάν υποθέσουμε ότι από 1 τόνο ελιάς παράγονται 0,8 τόνοι υγρού αποβλήτου του οποίου το οργανικό φορτίο εκτιμάται κατά προσέγγιση σε 80 g/l COD, τότε το εποχιακό ρυπαντικό φορτίο της διαδικασίας παραγωγής του ελαιολάδου αντιστοιχεί (ως προς το COD) σε ισοδύναμο ρυπαντικό φορτίο 22 εκατομμυρίων ατόμων για 1 έτος (Aktas et al. 2001).



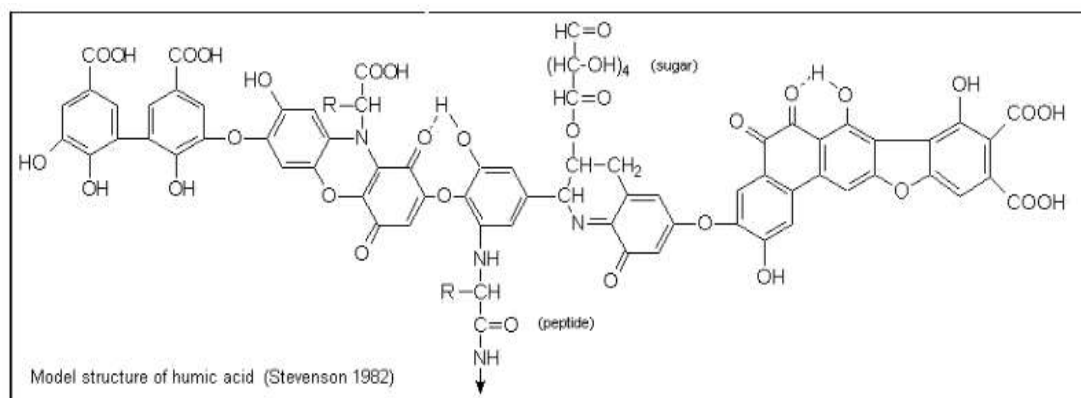
Εικόνα 2 - Διάγραμμα επεξεργασίας της ελιάς για την παραγωγή ελαιολάδου

Τα υγρά απόβλητα ελαιοτριβείων ως πηγή ρύπανσης εδώ και χιλιάδες χρόνια προβληματίζουν την ανθρωπότητα, όμως η επίδρασή τους στο περιβάλλον έχει γίνει ιδιαίτερα έντονη τα τελευταία χρόνια. Αυτό οφείλεται τόσο στην αύξηση της ελαιοπαραγωγής όσο και στη συσσώρευση των ελαιοτριβείων μεγάλης εμβέλειας σε συγκεκριμένες περιοχές (τα οποία παλιότερα ήταν μικρότερης δυναμικότητας και διασκορπισμένα). Η πιο συνηθισμένη πρακτική που ακολουθείται σήμερα για τα απόβλητα αυτά είναι η απόρριψή τους σε ρεματιές και στο έδαφος και σε μικρότερο βαθμό σε αποχετεύσεις, ποτάμια, θάλασσα κ.λπ. Οι τρόποι αυτοί διάθεσης εκτός από τα προφανή έντονα περιβαλλοντικά προβλήματα, δημιουργούν και άλλα προβλήματα στη διαβίωση των κατοίκων των γύρω περιοχών. Οι δυσάρεστες οσμές που αναδύονται λόγω των αναερόβιων ζυμώσεων στις υπαίθριες δεξαμενές προσωρινής αποθήκευσης καθώς και τα έντομα που συσσωρεύονται εκεί οδηγούν στην σταθερή υποβάθμιση της ποιότητας ζωής των κατοίκων.

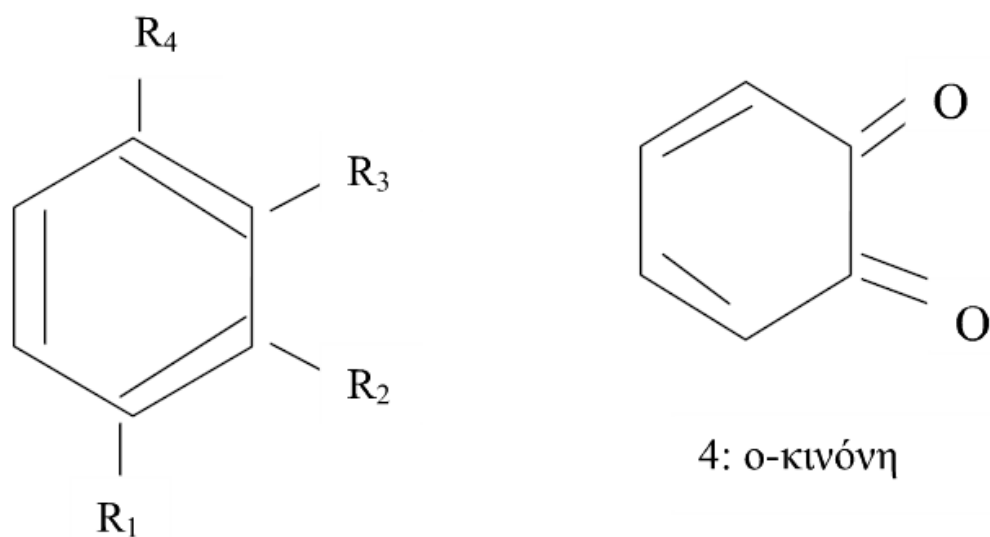
2.3.2 ΦΥΣΙΚΟΧΗΜΙΚΕΣ ΙΔΙΟΤΗΤΕΣ

Τα υγρά απόβλητα ελαιοτριβείων (Υ.Α.Ε.) περιέχουν συστατικά παρόμοια με αυτά του καρπού της ελιάς τα οποία εκχυλίζονται με το νερό. Έτσι λοιπόν η σύστασή τους δεν είναι σταθερή αλλά ποικίλλει ανάλογα με την ποικιλία της ελιάς, το στάδιο ωρίμανσης, την προσβολή του καρπού από έντομα, τις περιβαλλοντικές και τις καλλιεργητικές συνθήκες. Επίσης η μεγάλη διαφοροποίηση στη σύσταση του παραγόμενου αποβλήτου οφείλεται σε σημαντικό βαθμό στον τύπο του ελαιοτριβείου (κλασικό ή φυγοκεντρικό) με τα κλασικά ελαιοτριβεία να δίνουν πυκνότερο απόβλητο αλλά μικρότερους όγκους. Το μεγαλύτερο μέρος των στερεών που περιέχονται στα Υ.Α.Ε. αποτελείται από οργανική ουσία και το μικρότερο από ανόργανα άλατα. Τα σάκχαρα είναι το κυριότερο κλάσμα της οργανικής ουσίας των Υ.Α.Ε. και αποτελούνται κυρίως από τα εύκολα αφομοιώσιμα σάκχαρα γλυκόζη και φρουκτόζη. Επίσης σε μικρότερες ποσότητες ανευρίσκονται ενώσεις όπως η μαννόζη, η σουκρόζη και η ραφινόζη καθώς και ένα σακχαριδικό σύμπλοκο, η υδρόλυση του οποίου δίνει γαλακτόζη, γλυκόζη, αραβινόζη, ξυλόζη, ραμνόζη και γαλακτουρονικό οξύ. Εκτός από τα παραπάνω σάκχαρα ανευρίσκεται σε σημαντικές ποσότητες μία κατεχοϊμελανινική χρωστική η υδρόλυση της οποίας δίνει γλυκόζη, ραμνόζη, γαλακτόζη και αραβινόζη. Τα κυριότερα οργανικά οξέα που ανευρίσκονται στα Υ.Α.Ε είναι τα: οξικό, φουμαρικό, γλυκερικό, γαλακτικό, μαλικό, μαλονικό, ταρταρικό, οξαλικό και τρικαρβαλυλικό οξύ (Ranalli 1991a, b & c).

Οι ελεύθερες φαινόλες που απαντώνται στα Υ.Α.Ε., σχηματίζονται με ενζυμική υδρόλυση των διαφόρων γλυκοζιδίων και εστέρων της ελαιόπαστας κατά τη διάρκεια της εκχύλισης για την παραλαβή του ελαιολάδου. Θεωρείται ότι οι ελεύθερες φαινόλες είναι αυτές που παρουσιάζουν τη μεγαλύτερη τοξικότητα στους μικροοργανισμούς ταυτόχρονα όμως αποικοδομούνται ευκολότερα σε σύγκριση με τις πολυφαινολικές ενώσεις. Αντίθετα οι πολυφαινολικές ενώσεις οι οποίες είναι υπεύθυνες για το σκούρο χρώμα του αποβλήτου, είναι λιγότερο τοξικές και πιο δύσκολα αποικοδομήσιμες. Έτσι, παρατηρήθηκε ότι το χρώμα των υγρών αποβλήτων ελαιοτριβείων σκούραινε κατά τη διάρκεια της αποθήκευσής τους. Η αλλαγή αυτή στο χρώμα μπορεί να οφείλεται στην οξειδωση και στη συνέχεια στον πολυμερισμό των ταννινών που οδηγεί στο σχηματισμό σκουρόχρωμων πολυφαινολικών ουσιών (Assas et al. 2000). Οι πολυφαινολικές ενώσεις των Υ.Α.Ε. και οι ιδιότητές τους, παρομοιάζονται από αρκετούς ερευνητές με τις χουμικές ενώσεις και για την αποικοδόμησή τους έχουν χρησιμοποιηθεί μικροοργανισμοί οι οποίοι σχετίζονται με την αποικοδόμηση της λιγνίνης (Robles et al. 2000 a & b, Sayadi et al. 2000, Sayadi & Ellouz 1992).



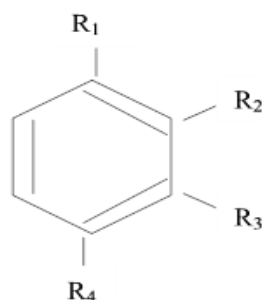
Εικόνα 3 - Στην εικόνα δίνονται οι κύριες φαινολικές ενώσεις (αλκοόλες και εστέρες) που απαντώνται στα Υ.Α.Ε.



Εικόνα 4 - Κυριότερες Φαινολικές Ενώσεις που Συναντώνται στα Απόβλητα Ελαιοτριβείων. (Νιαουννακίς & Χαλβαδάκης, 2006)

	R_1	R_2	R_3	R_4	ονομασία
1	OH	OH	H	H	Κατεχόλη
2	OH	OCH ₃	H	H	Γουεκόλη
3	OCH ₃	OCH ₃	H	H	Βερατρόλη
5	OAc	OAc	H	H	
6	OH	OH	H	CH ₃	4-μεθυλ-κατεχόλη
7	OAc	OAc	H	CH ₃	
8	OH	OH	H	CH ₂ CH ₂ OH	Υδροξυτυροσόλη
9	OAc	OAc	H	CH ₂ CH ₂ OH	Διακετυλ-1,2- υδροξυτυροσόλη
10	OAc	OAc	H	CH ₂ CH ₂ OAc	
11	OH	H	H	CH ₂ CH ₂ OH	1,4-τυροσόλη
12	OH	CH ₂ CH ₂ OH	H	H	1,2-τυροσόλη
13	OH	H	CH ₂ CH ₂ OH	H	1,3-τυροσόλη
14	OAc	H	H	CH ₂ CH ₂ OH	Μονοακετυλ-1,4-τυροσόλη
15	OAc	H	H	CH ₂ CH ₂ OAc	
16	OAc	CH ₂ CH ₂ OAc	H	H	Διακέτυλ-1,2-τυροσόλη
17	OAc	OH	CH ₂ CH ₂ OAc	H	Διακέτυλ-1,3-τυροσόλη

Εικόνα 5 - Φαινολικές Ενώσεις που Συναντώνται στα Απόβλητα Ελαιοτριβείων. (Νιαουννακίς & Χαλβαδάκης, 2006)



	R_1	R_2	R_3	R_4	ονομασία
1	COOH	H	OH	H	4-υδροξυβενζοϊκό οξύ
2	CH=CHCOOH	H	OH	H	4-υδροξυκινναμικό οξύ (p-κουμαρικό οξύ)
3	CH ₂ COOH	H	OH	H	4-υδροξυ-φαινυλοξικό οξύ
4	COOH	OH	OH	H	3,4-διυδροξυβενζοϊκό οξύ (πρωτο-κατεχοϊκό οξύ)
5	COOH	OCH ₃	OH	H	4-υδροξυ-3-μεθοξυβενζοϊκό οξύ (βανιλλικό οξύ)
6	COOH	OCH ₃	OCH ₃	H	3,4-διμεθοξυβενζοϊκό οξύ (βερατρικό οξύ)
7	CH=CHCOOH	OH	OH	H	3,4-διυδροξυκινναμικό οξύ (καφειϊκό οξύ)
8	COOH	OH	OH	OH	3,4,5-τριυδροξυβενζοϊκό οξύ (γαλλικό οξύ)
9	COOH	OCH ₃	OH	OCH ₃	3,5-διμεθοξυ-4-υδροξυβενζοϊκό οξύ (συρινγικό οξύ)

Εικόνα 6 - Κυριότερες Φαινολικές Ενώσεις που Συναντώνται στα Απόβλητα Ελαιοτριβείων.
(Niaounnakis & Halvadakis, 2006)

Εκτός από το οργανικό κλάσμα, τα Υ.Α.Ε. περιέχουν ανόργανα άλατα τα οποία αποτελούν σύμφωνα με πολλούς ερευνητές λιπαντικά στοιχεία που θα μπορούσαν να χρησιμοποιηθούν αντικαθιστώντας εξ ολοκλήρου τη χημική λίπανση σε συνδυασμό με τον εμπλουτισμό του εδάφους σε οργανική ουσία. Έτσι τα απόβλητα αυτά είναι ιδιαίτερα πλούσια σε κάλιο και φώσφορο ενώ περιέχουν σε μικρές ποσότητες και άλλα στοιχεία όπως ασβέστιο, μαγνήσιο, νάτριο. Ένα από τα μειονεκτήματα της χημικής σύστασής τους είναι η μικρή αναλογία σε C/N η οποία πιθανά να οδηγήσει σε παροδική ακινητοποίηση του εδαφικού αζώτου.

	<i>Μέσος όρος</i>	<i>Εύρος</i>	<i>C.V.</i>
Ξηρό βάρος (% υγρού)	7,19	4,12-16,38	3,87
pH	5,17	4,8-5,5	4,83
Αγωγιμότητα (dS/m)	5,5	4-13,98	41,73
Οργανική ουσία (% ξ.β.)	64,6	58,45-70,63	6,33
Ολικός οργανικός C (%)	47,5	43,61-53,45	6,46
Ολικό N (%)	0,88	0,58-1,13	25,18
P (%)	0,19	0,06-0,32	51,73
K (%)	5,24	3,3-6,94	23,18
Na (%)	0,15	0,04-0,48	114,97
Ca (%)	0,42	0,32-0,53	18,66
Mg (%)	0,18	0,06-0,22	26,1
Fe (mg/kgr)	951	652-1482	31,83
Cu (mg/kgr)	21	14-44	40,63
Mn (mg/kgr)	15	1-53	110,07
Zn (mg/kgr)	57	31-82	31,55
Πυκνότητα (g/cm ³)	1,02	1,01-1,06	1,3
Λίπη (% ξ.β.)	4,27	0,55-11,37	84,41
Πολυφαινόλες (% ξ.β.)	2,21	1,32-3,99	35,8
Υδατάνθρακες (% ξ.β.)	12,22	3,37-32,91	76,79

Εικόνα 7 - Στην εικόνα δίνεται η ανάλυση των αποβλήτων από 10 ελαιοτριβεία διαφόρων περιοχών της νοτίου Ισπανίας (μέση τιμή, εύρος μετρήσεων και ο συντελεστής μεταβλητότητας)

Στην ίδια μελέτη διαπιστώθηκε ότι υπάρχει γραμμική συσχέτιση της περιεκτικότητας ενός αποβλήτου σε ξηρή ουσία με τα υπόλοιπα χαρακτηριστικά του (αγωγιμότητα, οργανική ουσία, ολικός οργανικός C, κύρια μακρο- και ιχνο-στοιχεία, και πολυφαινόλες) (Paredes et al. 1999).

3. ΜΕΘΟΔΟΙ ΔΙΑΧΕΙΡΙΣΗΣ ΥΓΡΩΝ ΑΠΟΒΛΗΤΩΝ

3.1 ΣΥΣΤΑΣΗ ΑΠΟΒΛΗΤΩΝ ΕΛΑΙΟΥΡΓΕΙΩΝ

Τα υγρά απόβλητα του ελαιοτριβείου, χαρακτηρίζονται από:

- Έντονα ιώδες-σκούρο καφέ έως μαύρο χρώμα.
- Πολύ έντονη μυρωδιά ελαιολάδου.
- Πολύ μεγάλο οργανικό φορτίο (τιμές COD μέχρι και 220g/l).
- Τιμές pH μεταξύ 3 και 6.
- Υψηλή ηλεκτρική αγωγιμότητα .
- Μεγάλη συγκέντρωση πολυφαινολικών ενώσεων (από 0,5 έως 24g/l).
- Μεγάλη περιεκτικότητα σε στερεή ουσία.

Τα υγρά απόβλητα του ελαιοτριβείου, ανήκουν στα Γεωργικά απόβλητα, που το εύρος των τιμών τους, επηρεάζεται από παράγοντες όπως:

- Κλιματολογικές συνθήκες.
- Ποικιλία ελιών.
- Ηλικία ωρίμανσης των καρπών.
- Χρήση φυτοφαρμάκων και λιπασμάτων.
- Τύπος εδάφους.
- Τύπος τεχνολογίας παραγωγής.
- Χρόνος συγκομιδής και αποθήκευσης, πριν την επεξεργασία.

Από τα συστατικά που περιέχονται στον κασίγαρο, **οι πολυφαινόλες** παρουσιάζουν ιδιαίτερο ενδιαφέρον, διότι από τη μία πλευρά προσδίδουν στα απόβλητα τοξικές ιδιότητες έναντι των φυτών και αποδομούνται με βραδύ σχετικά ρυθμό, από εξειδικευμένες ομάδες μικροοργανισμών, ενώ από την άλλη είναι υπεύθυνες για τη συντήρηση της ποιότητας του λαδιού στο χρόνο (χαμηλή οξύτητα) ως φυσικό συντηρητικό.

Επειδή, η παραγωγή του ελαιολάδου είναι μία φυσική διαδικασία, πρέπει να σημειωθεί ότι ο κασίγαρος δεν περιέχει άλλες ουσίες που είναι ιδιαίτερα τοξικές, όπως τα βαρέα μέταλλα και οι συνθετικές οργανικές ενώσεις.

Το υψηλό οργανικό φορτίο του κασίγαρου, σε συνάρτηση με την παρουσία των πολυφαινολών, δεν επιτρέπει την απευθείας διάθεση του στο περιβάλλον, αλλά καθιστά αναγκαία την περαιτέρω επεξεργασία του.

Για την επεξεργασία και διάθεση του κασίγαρου έχουν δοκιμαστεί διάφορες μέθοδοι σε εργαστηριακή και πραγματική κλίμακα. Παρόλα αυτά, μέχρι σήμερα δεν έχει προταθεί μία ολοκληρωμένη λύση, αλλά έχουν εφαρμοστεί διάφορες τεχνικές κατά περίπτωση, που παρουσιάζουν ορισμένα μειονεκτήματα τεχνικής ή οικονομικής φύσεως και δεν έχουν επιλύσει ικανοποιητικά το πρόβλημα.

3.2 ΜΕΘΟΔΟΙ ΔΙΑΧΕΙΡΙΣΗΣ Υ.Α.Ε.

3.2.1 ΑΕΡΟΒΙΑ ΒΙΟΛΟΓΙΚΗ ΕΠΕΞΕΡΓΑΣΙΑ

Κατά την διαδικασία της αερόβιας βιολογικής επεξεργασίας των Υ.Α.Ε. η απομάκρυνση του οργανικού φορτίου γίνεται μέσω οξειδωτικών μικροβιακών διεργασιών για τις οποίες απαιτείται οξυγόνο. Η βιολογική απαίτηση σε οξυγόνο (BOD) είναι ανάλογη με το οργανικό φορτίο του αποβλήτου το οποίο μπορεί να χρησιμοποιηθεί από τους μικροοργανισμούς. Η χημική απαίτηση σε οξυγόνο (COD), η οποία είναι ιδιαίτερα υψηλή στα Υ.Α.Ε., είναι ανάλογη της συνολικής οργανικής ουσίας των αποβλήτων και σε αυτήν περιλαμβάνεται και το κλάσμα της οργανικής ουσίας η οποία είναι μη αποικοδομήσιμη από τους διάφορους μικροοργανισμούς. Κατά τη μελέτη της αποτελεσματικότητας των διαφόρων μικροοργανισμών που έχουν εξεταστεί, η μείωση του COD και της συγκέντρωσης των φαινολικών σε πολύ χαμηλά επίπεδα είναι ο στόχος, για να μπορέσει το τελικό προϊόν να οδηγηθεί σε βιολογικούς καθαρισμούς αστικών και βιομηχανικών λυμάτων καθώς και σε υδάτινους αποδέκτες. Επίσης το χρονικό διάστημα στο οποίο επιτυγχάνεται η μείωση των παραπάνω παραμέτρων και η οποία είναι ανάλογη με το χρόνο παραμονής του αποβλήτου στο βιοαντιδραστήρα, θα πρέπει να είναι μικρή για την

πρακτική εφαρμογή της μεθόδου, αφού τα απόβλητα αυτά παράγονται σε τεράστιους όγκους σε μικρό χρονικό διάστημα. Για την αερόβια αυτή επεξεργασία έχουν χρησιμοποιηθεί διάφορα μικροβιακά στελέχη σε διαφορετικούς τύπους βιοαντιδραστήρων.

Είδη του γένους *Aspergillus* έχουν χρησιμοποιηθεί για την αερόβια επεξεργασία των Υ.Α.Ε. με ικανοποιητικά αποτελέσματα. Στελέχη των ειδών *Aspergillus niger* και *Aspergillus terreus* μελετήθηκαν ως προς την ικανότητά τους να μειώνουν το COD του αποβλήτου και τη συγκέντρωση των φαινολικών. Σε χρονικό διάστημα 4-5 ημερών το στέλεχος του *Aspergillus niger* μείωσε κατά 73% το COD και κατά 76% τις ολικές φαινόλες ενώ τα αντίστοιχα ποσοστά για το στέλεχος του *Aspergillus terreus* ήταν 64% μείωση του COD και 64% των ολικών φαινολών στο ίδιο χρονικό διάστημα (García García et al. 2000). Επιπλέον εξετάστηκε η επίδραση του μεγέθους του εμβολίου και της προσθήκης ανόργανων αλάτων ως προς τη βελτιστοποίηση της αερόβιας επεξεργασίας των αποβλήτων με στέλεχος του *Aspergillus niger*. Φάνηκε ότι η πηγή αζώτου, τα θειικά ιόντα και το μέγεθος του εμβολίου επηρέαζαν άμεσα την ανάπτυξη του μύκητα και κατά συνέπεια τη μείωση του COD. Η υψηλότερη παραγωγή βιομάζας και η μεγαλύτερη απομάκρυνση του COD επιτεύχθηκαν με αναλογία COD:N:SO₄ της τάξης του 100:3:1,5 και η άριστη συγκέντρωση εμβολίου κυμάνθηκε μεταξύ 106 και 107 σπόρια ανά g COD. Η προσθήκη εκχυλίσματος ζύμης, μαγνησίου, νάτριου, καλίου ή ασβεστίου δεν επηρέασαν την ανάπτυξη του μύκητα (Hamdi et al. 1991). Επίσης ο μύκητας *Aspergillus niger* χρησιμοποιήθηκε και για τη βελτίωση της διηθητικότητας των Υ.Α.Ε (η οποία σχετίζεται με τη μείωση των στερεών του αποβλήτου). Σε χρονικό διάστημα τριών ημερών επιτεύχθηκε μείωση του COD και των ολικών στερεών κατά 50%. Τα θετικά αποτελέσματα αποδόθηκαν στην αποικοδόμηση της οργανικής ουσίας και στο ότι ένα μέρος των στερεών παγιδεύονται στις υφές του μύκητα και έτσι μπορούν να απομακρυνθούν εύκολα (Hamdi & Ellouz 1992). Ο λιγνινολυτικός μύκητας *Phanerochaete chrysosporium* όταν καλλιεργήθηκε σε Υ.Α.Ε. με αρχικό COD 83 g/l απέδωσε 75% μείωση του COD και 92% μείωση της συγκέντρωσης των ολικών φαινολικών ουσιών σε 6 ημέρες (García García et al. 2000). Επίσης έγινε προσπάθεια καλλιέργειας του μύκητα σε αραιωμένα απόβλητα στα οποία προστέθηκε ένα βασικό συνθετικό θρεπτικό υπόστρωμα (η αραιώση

ήταν τέτοια ώστε να αντιστοιχούν 53 g COD/l και το βασικό υπόστρωμα αποτελούνταν από ανόργανα άλατα). Παρατηρήθηκε 74% μείωση του χρώματος και 80% απομάκρυνση του COD σε χρονικό διάστημα εννέα ημερών όταν στις καλλιέργειες προστέθηκε veratryl alcohol (η οποία αυξάνει τη δραστικότητα της υπεροξειδάσης της λιγνίνης-LiP) και όταν ο αερισμός γίνονταν με καθαρό O₂ (διεγείρει την αποικοδόμηση της λιγνίνης και την παραγωγή LiP). Φάνηκε ότι το λιγνινολυτικό σύστημα του μύκητα είναι αυτό που εμπλέκεται στον αποχρωματισμό του αποβλήτου το οποίο σχετίζεται άμεσα με τη διάσπαση των μεγάλου μοριακού βάρους πολυφαινολικών και τη βιοαποικοδόμηση των μικρού μοριακού βάρους αρωματικών ουσιών. Το λιγνινολυτικό σύστημα και ιδιαίτερα η LiP σχετίζονται με τη βιοαποικοδόμηση ουσιών όπως τα χουμικά οξέα και οι πολυκυκλικοί αρωματικοί υδρογονάνθρακες (Sayadi & Ellouz 1992). Το ενζυμικό σύστημα και η κινητική της αύξησης του *Phanerochaete chrysosporium* μελετήθηκε και σε συνθετικό θρεπτικό υπόστρωμα στο οποίο είχαν προστεθεί χημικά καθαρές φαινόλες, χλωροφαινόλες και χρωστικές (Mamimekalai & Swaminathan 2000). Ένας άλλος λιγνινολυτικός μύκητας ο *Pleurotus ostreatus* (εδώδιμο μανιτάρι) καλλιεργήθηκε σε αραιωμένο απόβλητο 1:10. Παρατηρήθηκε μείωση της συγκέντρωσης των φαινολικών κατά 90% καθώς και της τοξικότητάς του σε ευαίσθητους μικροοργανισμούς (*Bacillus cereus*) κατά επτά φορές σε σχέση με το ανεπεξέργαστο απόβλητο σε χρονικό διάστημα 100 ωρών. Μετά από 15 ημέρες καλλιέργειας η μείωση του χρώματος έφτασε στο 71% ενώ η μεγαλύτερη δραστικότητα του ενζύμου οξειδάσης της φαινόλης παρατηρήθηκε τη 13η ημέρα (Martinari et al. 1996). Ο *Geotrichum candidum*, είναι ένας ακόμα μύκητας γνωστός για την ικανότητά του να αποικοδομεί μεγάλο εύρος απλών αρωματικών ενώσεων. Όταν καλλιεργήθηκε σε Υ.Α.Ε., σε χρονικό διάστημα 25 ωρών επέφερε μείωση του COD κατά 44% ενώ δεν επέδρασε καθόλου στη συγκέντρωση των φαινολικών. Η παράταση της καλλιέργειάς του για μεγαλύτερο χρονικό διάστημα ή η χρήση αποβλήτου σε αραιώση 1: 3 δεν άλλαξαν την εικόνα αυτή (García García et al 2000). Επίσης μελετήθηκε η επίδραση της αραιώσης του αποβλήτου, του αερισμού καθώς και της προσθήκης θειικού αμμωνίου, στη μείωση του χρώματος και στην απομάκρυνση του COD από τον ίδιο μύκητα. Διαπιστώθηκε ότι η αναλογία COD: N: S της τάξης του 100:5:2 είναι η αποτελεσματικότερη για τη μείωση του χρώματος (55,5%) και ότι ο

ρόλος του αερισμού είναι σημαντικός στο σχηματισμό μυκηλιακής βιομάζας (σε σχέση με το σχηματισμό σπορίων) η οποία οδηγεί σε μεγαλύτερη μείωση του χρώματος. Η αραίωση του αποβλήτου είχε θετικότερα αποτελέσματα στη μείωση του χρώματος παρά στη μείωση του COD (Assas et al. 2000). Τα είδη του γένους *Penicillium* αποικοδομούν και αυτά διάφορες αρωματικές ενώσεις οι οποίες σχετίζονται με τη λιγνίνη καθώς και άλλες φαινολικές ενώσεις και θεωρήθηκαν ως υποψήφιοι αποικοδομητές των Υ.Α.Ε. Έτσι εξετάστηκαν επτά στελέχη του γένους αυτού τα οποία απομονώθηκαν από φυσικές δεξαμενές διάθεσης των αποβλήτων. Το στέλεχος που έδωσε τα καλύτερα συνολικά αποτελέσματα μείωσε το COD κατά 40%, τις ολικές φαινόλες κατά 45% και το χρώμα κατά 20% σε χρονικό διάστημα είκοσι ημερών ενώ η βιοτοξικότητα του αποβλήτου εξαφανίστηκε στις δώδεκα ημέρες καλλιέργειας (Robles et al. 2000). Η ζύμη *Yarrowia lipolytica* η οποία επιλέχθηκε μεταξύ διαφόρων άλλων ζυμών για την ικανότητά της να αυξάνει καλύτερα στα Υ.Α.Ε., καλλιεργήθηκε σε απόβλητο χωρίς αραίωση, στο οποίο είχαν προστεθεί 0,6% θειικού αμμωνίου και 0,1% εκχύλισμα ζύμης. Παρατηρήθηκε μείωση του COD κατά 80% σε 24 ώρες, ενώ παραλήφθηκαν 22,45 g/l χρήσιμης βιομάζας καθώς και ενζυμική λιπάση (Scioli et al. 1997). Μελετήθηκε επίσης η αποικοδόμηση μονοκυκλικών αρωματικών ουσιών οι οποίες απαντώνται στα υγρά απόβλητα, από τα βακτηριακά στελέχη *Ralstonia* sp. LD35 και *Pseudomonas putida* DSM1868. Οι δοκιμές έγιναν σε συνθετικά μέσα καλλιέργειας, καθώς και σε κλάσματα τα οποία παρελήφθησαν είτε από το απόβλητο είτε από αναερόβιο βιοαντιδραστήρα (τα οποία ήταν πλούσια σε μονοκυκλικές αρωματικές ενώσεις). Η συγκαλλιέργεια των δύο βακτηριακών στελεχών έδωσε καλύτερα αποτελέσματα λόγω της συμπληρωματικότητας που εμφάνισαν, και αποικοδομήθηκαν οι 7 από τις 9 ενώσεις που δοκιμάστηκαν στο συνθετικό υπόστρωμα. Επίσης στα κλάσματα του αποβλήτου που εξετάστηκαν, παρατηρήθηκε επιτυχής αύξηση και των δύο στελεχών και αποικοδόμηση των αρωματικών ουσιών (Di Gioia et al. 2001a & b). Μελετήθηκε επίσης και η κινητική της αποικοδόμησης υγρών αποβλήτων ελαιοτριβείων σε διάφορες αραιώσεις από μικτή μικροβιακή χλωρίδα η οποία προήρθε μετά από προσαρμογή ενεργής λάσπης βιολογικού καθαρισμού αστικών αποβλήτων. Προστέθηκαν άλατα στο υπόστρωμα ώστε να διατηρείται η αναλογία COD: N: P στο 100:5:1 και η επώαση διήρκεσε 7 ημέρες. Η μείωση του COD που

παρατηρήθηκε κυμαινόταν από 58-84% και ήταν αντιστρόφως ανάλογη προς την αραίωση ενώ τα φαινολικά μειώθηκαν σε ποσοστά μεγαλύτερα του 90% σε όλα τα πειράματα (Benitez et al. 1997b).

3.2.2. ΑΕΡΟΒΙΑ ΕΠΕΞΕΡΓΑΣΙΑ ΤΟΥ ΑΠΟΒΛΗΤΟΥ ΕΛΑΙΟΤΡΙΒΕΙΩΝ ΓΙΑ ΠΑΡΑΓΩΓΗ ΜΙΚΡΟΒΙΑΚΗΣ ΒΙΟΜΑΖΑΣ ΚΑΙ ΜΙΚΡΟΒΙΑΚΩΝ ΜΕΤΑΒΟΛΙΤΩΝ

Το υγρό απόβλητο ελαιοτριβείων έχει δοκιμαστεί ως υπόστρωμα για την καλλιέργεια διαφόρων μικροοργανισμών οι οποίοι χρησιμοποιούνται είτε για την παραγωγή χρήσιμης βιομάζας είτε για τα μεταβολικά τους προϊόντα. Αραιωμένο Υ.Α.Ε. χρησιμοποιήθηκε για την παραγωγή βιομάζας (μυκηλίου) από τους εδώδιμους μύκητες *Pleurotus eryngii* και *Pleurotus pulmonarius* καθώς και για την παραγωγή μανιταριών από τους ίδιους μύκητες,. Ως στερεό υπόστρωμα στην περίπτωση της παραγωγής μανιταριών χρησιμοποιήθηκε ελαιοπυρήνας ή ελαιοπυρήνας ο οποίος είχε διαβρεχτεί με υγρά απόβλητα ελαιοτριβείων (Zervakis et al. 1996). Επίσης αραιωμένο Υ.Α.Ε. χρησιμοποιήθηκε για την παραγωγή βιομάζας από τα μικροφύκη *Chlorella pyrenoidosa* και *Scenedesmus obliquus* (Sanchez Villasclaras et al. 1996). Μια άλλη εφαρμογή του αραιωμένου Υ.Α.Ε. μπορεί να αποτελέσει η χρήση του ως υπόστρωμα χαμηλού κόστους για την παραγωγή ξανθάνης από στέλεχος του γένους *Xanthomonas campestris*. Η ξανθάνη είναι ένας εξωκυτταρικός πολυσακχαρίτης ο οποίος λόγω των ρεολογικών του ιδιοτήτων χρησιμοποιείται ευρέως σε βιομηχανίες τροφίμων, καλλυντικών, φαρμακευτικών προϊόντων, κ.ά. Τα Υ.Α.Ε. μπορούν να βελτιωθούν ως υπόστρωμα με την προσθήκη αζώτου και αλάτων (Lopez et al. 1996). Χρησιμοποιήθηκαν επίσης τα Υ.Α.Ε. ως συμπλήρωμα σε συνθετικά θρεπτικά υποστρώματα για την καλλιέργεια στελέχους του είδους *Azotobacter chroococcum* και την παραγωγή PHAs

(polyhydroxyalkanoates). Τα PHAs και συγκεκριμένα το PHB (poly-β-hydroxybutyrate) το οποίο παράγεται από το στέλεχος που μελετήθηκε και είναι από τα πιο συνήθη, παρουσιάζουν ιδιαίτερο ενδιαφέρον ως βιοαποικοδομήσιμα πλαστικά λόγω του ότι εμφανίζουν δομή παρόμοια με του πολυπροπυλενίου (Gonzalez-Lopez et al. 1996). Στέλεχος του γένους *Pseudomonas* καλλιεργήθηκε σε Υ.Α.Ε. για την παραγωγή βιο-τασιενεργών ουσιών (biosurfactant). Οι ουσίες αυτές παρουσιάζουν ενδιαφέρον διότι είναι βιοαποικοδομήσιμες και αποτελεσματικές σε ακραίες συνθήκες pH, θερμοκρασίας και αλατότητας. Έτσι, μελετήθηκε η ικανότητα παραγωγής ραμνολιπιδίων από το στέλεχος αυτό και παρελήφθησαν 0,058 g ραμνολιπιδίων/ g υποστρώματος (όπως υπολογίζεται από το αρχικό COD) (Mercadé et al. 1993). Η χρήση γεωργικών αποβλήτων ως υπόστρωμα για την παραγωγή μικροβιακών βιοπολυμερών μπορεί σε πολλές περιπτώσεις να έχει υψηλότερο κόστος σε σχέση με την ήδη υπάρχουσα τεχνολογία χρησιμοποίησης συνθετικών υποστρωμάτων. Ένα μέρος του επιπλέον κεφαλαίου που μπορεί να απαιτείται, θα πρέπει να καλυφθεί από τη διάθεση του ανεπιθύμητου αποβλήτου. Δυσκολίες επίσης μπορεί να εμφανίζονται σε άλλους τομείς, όπως στην ποιότητα και στις ιδιότητες των προϊόντων που παραλαμβάνονται. Η έρευνα όμως που πλέον κατευθύνεται προς τη χρήση τεχνολογιών φιλικών προς το περιβάλλον σίγουρα θα βοηθήσει στην ανεύρεση λύσεων με δυνατότητες εφαρμογής (Sutherland 1996).

Γενικά οι τεχνικές που χρησιμοποιούνται για την διαχείριση των αποβλήτων ενός ελαιουργείου εναλλάσσονται από περιοχή σε περιοχή και από χώρα σε χώρα. Γενικά ισχύει ο παρακάτω πίνακας τεχνικών σωστής διαχείρισης των αποβλήτων

Μηχανική επεξεργασία.	Βιολογική επεξεργασία.	Φυσικοχημική επεξεργασία.
1) Διήθηση (<i>Filtration</i>).	1) Λίμνες Εξάτμισης (<i>Lagoons</i>).	1) Διαχωρισμός με μεμβράνες. (<i>Membrane separation</i>).
2) Επίπλευση (<i>Flotation</i>).	2) Μέθοδος Ενεργού ιλύος (<i>Activated</i>	2) Αποτέφρωση (<i>Incineration</i>).

	Sludge).	
3) Καθίζηση (Sedimentation).	(α) Απομάκρυνση Αμμωνιακού Αζώτου.	
4) Απολίπωση (Degreasing).	(β) Απομάκρυνση Φωσφόρου.	

Πίνακας 1 - Τεχνικές σωστής διαχείρισης των αποβλήτων

1) Διήθηση (Filtration). Η διήθηση, είναι μια από τις παλαιότερες μεθόδους για την απομάκρυνση των στερεών από τα υγρά απόβλητα. Τα στερεά περιλαμβάνουν άργιλο και ιλύ, οργανική ουσία, ιζήματα από άλλες επεξεργασίες, σίδηρο, μαγγάνιο και μικροοργανισμούς. Ο διαχωρισμός γίνεται με τη βοήθεια πορώδους υλικού που συγκρατεί τα στερεά και επιτρέπει τη διέλευση της υγρής φάσης. Τα φίλτρα μπορεί να είναι στρώματα άμμου, αμμοχάλικου ή ενεργού άνθρακα που βοηθούν στην αφαίρεση και των πιο μικρών μορίων.

Συνήθως, η διήθηση χρησιμοποιείται για την απομάκρυνση των στερεών υλικών από τα υγρά απόβλητα που μπορεί να εμποδίσουν την περαιτέρω επεξεργασία (πχ φράξιμο σωλήνων). Η διήθηση για την απομάκρυνση των αιωρούμενων στερεών από τα υγρά απόβλητα βασίζεται στις μεθόδους διαχωρισμού μεμβρανών.

2) Επίπλευση (Flotation): Η επίπλευση, είναι μια μηχανική μέθοδος διαχωρισμού των αιωρούμενων στερεών από τα υγρά απόβλητα. Η χρήση ενός αερίου στο σύστημα, όπως αέρα ή αζώτου, διευκολύνει το διαχωρισμό. Η αρχή της μεθόδου είναι απλή. Το αέριο διοχετεύεται υπό πίεση στα απόβλητα σχηματίζοντας λεπτές φυσαλίδες και προσροφάται στην επιφάνεια των στερεών, μειώνοντας το ειδικό βάρος και διευκολύνοντας το διαχωρισμό. Για τη διευκόλυνση της διαδικασίας χρησιμοποιούνται χημικές ουσίες όπως:

I. Ουσίες που προκαλούν αφρισμό (*foaming chemicals*). Η δημιουργία αφρού σταθεροποιεί τις φυσαλίδες και τον αφρό στην επιφάνεια της δεξαμενής. Σε διαφορετική περίπτωση, εάν σταματήσει ο σχηματισμός φυσαλίδων και αφρού, τα αιωρούμενα στερεά θα κατακρημνιστούν.

II. Ουσίες που καθιστούν τα αιωρούμενα στερεά υδρόφοβα. Με τη χρήση των ουσιών αυτών, τα αιωρούμενα στερεά προσκολλώνται ευκολότερα στις φυσαλίδες του αέρα και κινούνται προς την επιφάνεια. Αυτοί οι χημικοί παράγοντες καλούνται επίσης συλλέκτες (*collectors*).

III. Μερικοί ρυθμιστικοί παράγοντες όπως ρυθμιστές pH, ουσίες που προκαλούν κροκίδωση, κλπ.

Εφαρμόζονται διάφοροι τύποι επίπλευσης, οι όποιοι διαφέρουν κυρίως στον τρόπο που παράγονται οι φυσαλίδες. Η επίπλευση με διαλυμένο αέρα (*dissolved air flotation*), είναι η ευρύτερη μέθοδος που εφαρμόζεται λόγω της αποτελεσματικότητας στην απομάκρυνση μεγάλου εύρους στερεών. Μέχρι τώρα, η επίπλευση χρησιμοποιούνταν μόνο σε πειραματικό στάδιο για την επεξεργασία των αποβλήτων των ελαιοτριβείων. Η επίπλευση μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την αφαίρεση της πολύ λεπτής φάσης ελαίου (γαλάκτωμα) στα απόβλητα, αλλά η εφαρμογή παραμένει οριακή λόγω της χαμηλής αναλογίας δαπάνη/όφελος.

3) Καθίζηση (*Sedimentation*) :Η καθίζηση στηρίζεται στη μεγαλύτερη πυκνότητα των μορίων από αυτή του νερού για την απομάκρυνσή τους από την υδατική φάση. Η διαδικασία μπορεί να είναι φυσική (κατακρήμνιση λόγω βαρύτητας) ή εξαναγκασμένη (σε φυγοκεντρικό διαχωριστή ή κυκλώνα). Μετά από την αφαίρεση των ογκωδών στερεών, τα υγρά απόβλητα ρέουν στις δεξαμενές καθίζησης, όπου η ταχύτητα ροής μειώνεται και τα αιωρούμενα υλικά βυθίζονται στον πυθμένα της δεξαμενής. Σε αυτό το στάδιο απομακρύνεται το 50% περίπου των διαλυμένων στερεών και το 35% του BOD. Επίσης, τα συστατικά που επιπλέουν όπως το έλαιο συλλέγονται από την επιφάνεια των δεξαμενών. Το υλικό που καθιζάνει (ιλύς), συλλέγεται σε μια χοάνη και οδηγείται για περαιτέρω επεξεργασία. Μερικές φορές χρησιμοποιείται ασβέστης για τον έλεγχο των ανεπιθύμητων οσμών.

4) Απολίπωση (*Degreasing*): Πριν την επεξεργασία των υγρών αποβλήτων στο σύστημα βιολογικού καθαρισμού, θα πρέπει πρώτα να απομακρυνθεί η λιπαρή φάση με τη χρήση παγίδας λιπών, δεδομένου ότι εμποδίζουν την ομαλή λειτουργία των βιολογικών εγκαταστάσεων επεξεργασίας υγρών αποβλήτων. Παράγοντας αποφασιστικής σημασίας για την επιλογή του κατάλληλου συστήματος

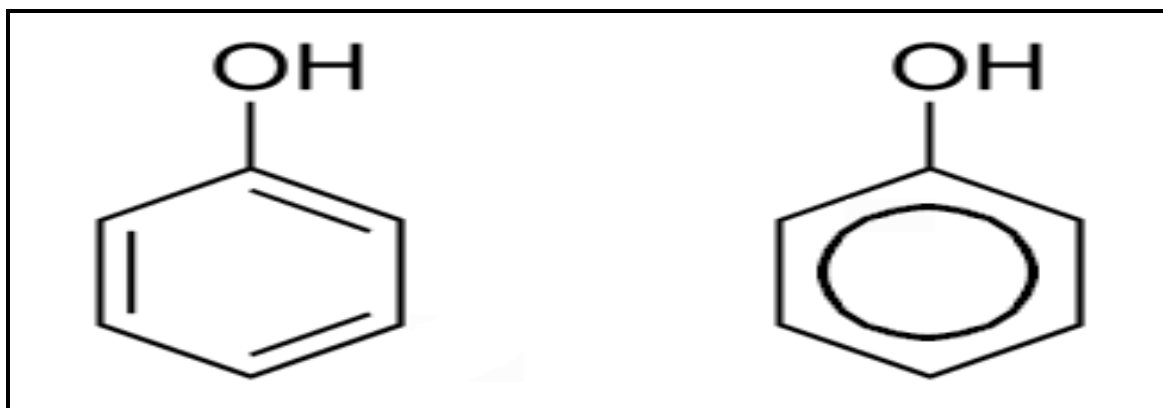
απολίπωσης είναι το μέγεθος των ελαιοσταγονιδίων. Όσο μεγαλύτερα είναι τα σταγονίδια, τόσο μεγαλύτερη είναι η τάση τους να σχηματίσουν ένα φιλμ ελαίου στην επιφάνεια του νερού, για την απομάκρυνση του οποίου χρησιμοποιούνται ειδικές συσκευές, οι απολιπωτές (*oil skimmer*). Οι συσκευές αυτές είναι ιμάντες ή δίσκοι από χάλυβα ή πλαστικό που βυθίζονται συνεχώς στα υγρά απόβλητα. Το έλαιο προσκολλάται στην υδρόφιλη φάση και στη συνέχεια απομακρύνεται από την επιφάνεια. Στην περίπτωση που τα σταγονίδια του ελαίου είναι πολύ μικρά ή η συγκέντρωση του ελαίου είναι χαμηλή, χρησιμοποιούνται οι φυγοκεντρικοί διαχωριστές ή διαχωριστές βαρύτητας.

4. ΠΟΛΥΦΑΙΝΟΛΕΣ ΚΑΙ ΑΠΟΒΛΗΤΑ ΕΛΑΙΟΥΡΓΕΙΩΝ

4.1 ΠΟΛΥΦΑΙΝΟΛΕΣ

Πολυφαινόλες – (Polyphenols): Είναι μία τάξη φυσικών, συνθετικών και ημισυνθετικών οργανικών χημικών, οι οποίες χαρακτηρίζονται από την παρουσία πολλών φαινολικών δομών.

Σύνθετο ουσιαστικό, που σχηματίζεται από την λέξη (πολύ) και την λέξη (φαινόλη), η οποία αναφέρεται σε μία χημική δομή ενός βενζοϊκού δακτυλίου (αρωματικός υδρογονάνθρακας) και μίας υδροξυλικής ομάδας (-OH), που βρίσκονται σε δεσμό μεταξύ τους. Είναι δηλαδή, μόρια όπου έχουν μία υδροξυλική ομάδα, σε δεσμό με το άτομο του άνθρακα του αρωματικού δακτυλίου. Ο χημικός τύπος της φαινόλης (Φαινικό οξύ) είναι C_6H_5OH , το απλούστερο των φαινολών.



Εικόνα 8 - Φαινολικό (Φαινικό οξύ): Η απλούστερη φαινόλη

4.1.1 ΦΥΣΙΚΕΣ ΙΔΙΟΤΗΤΕΣ ΠΟΛΥΦΑΙΝΟΛΩΝ

Είναι χαμηλού μοριακού βάρους. Συνήθως σε υγρή μορφή ή σε στερεή με χαμηλό σημείο τήξεως. Λόγω των δεσμών υδρογόνου, οι φαινόλες μικρού μοριακού βάρους, είναι υδατοδιαλυτές. Τείνουν να έχουν υψηλότερα σημεία βρασμού, από τις αλκοόλες ιδίου μοριακού βάρους, λόγω του ισχυροτέρου δεσμού υδρογόνου που έχουν.

Αρκετές από τις πολυφαινόλες Εμφανίζουν **υψηλή** οξύτητα. Το μόριο της φαινόλης έχει υψηλή οξύτητα, διότι έχει μερικώς θετικό φορτίο στο άτομο του οξυγόνου, λόγω συντονισμού και το ανιόν το οποίο σχηματίζεται από την απώλεια ενός υδρογόνου, σταθεροποιείται και αυτό με το συντονισμό.

4.1.2 ΚΑΤΗΓΟΡΙΕΣ ΦΥΤΙΚΩΝ ΠΟΛΥΦΑΙΝΟΛΩΝ

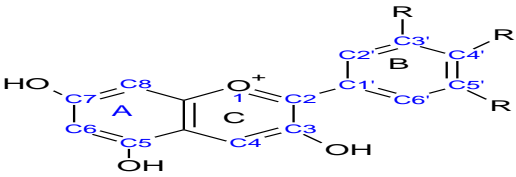
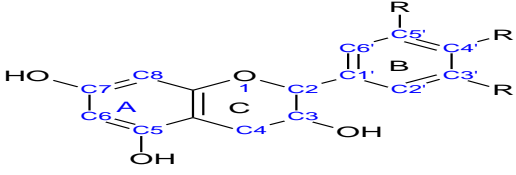
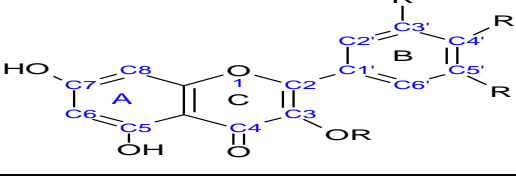
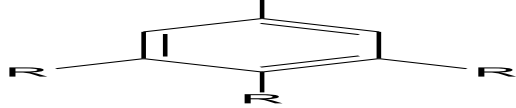
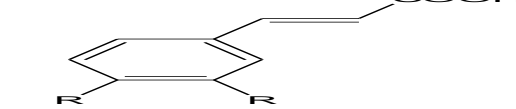
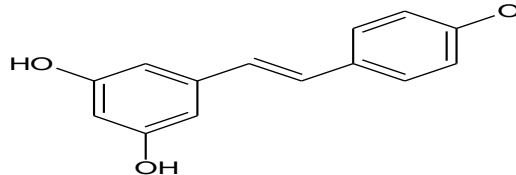
Οι φυτικές πολυφαινόλες είναι μία μεγάλη και ετερογενής κατηγορία χημικών ενώσεων που παράγονται ως δευτερογενείς μεταβολίτες από τα φυτά (Bravo, 1998). Έχουν αναγνωριστεί ως τώρα χιλιάδες τέτοιων ενώσεων στα ανώτερα φυτά, και ιδιαίτερα σε εδώδιμα φυτά, τα προϊόντα των οποίων αποτελούν τρόφιμα της καθημερινής διατροφής.

Η χημειοπροστατευτική δράση των φυτικών τροφών, οφείλεται στα φυτοχημικά τους συστατικά:

- Τα φυτοχημικά συστατικά είναι μη θρεπτικά συστατικά που έχουν σημαντική βιολογική δράση.
- Δρουν ως αντιοξειδωτικά και έχουν δράση παρόμοια με αυτή των ορμονών.
- Συνήθως, δρουν συνεργικά, δηλαδή εμφανίζουν ισχυρότερη δράση όταν συνδυάζονται διαφορετικές κατηγορίες φυτοχημικών.
- Παίζουν ρόλο στον καθορισμό της γεύσης, του αρώματος, των χρωμάτων και άλλων χαρακτηριστικών των φυτικών τροφών.

Φρούτα, λαχανικά καθώς και ροφήματα όπως το κόκκινο κρασί, ο καφές και το τσάι, αποτελούν καλές πηγές πολυφαινολών. Τα τελευταία χρόνια έχει αναπτυχθεί ολοένα και αυξανόμενο ενδιαφέρον για τις φυτικές πολυφαινόλες, που οφείλεται κυρίως στην αναγνώριση των αντιοξειδωτικών τους ιδιοτήτων καθώς και της πιθανής χημειοπροστατευτικής τους επίδρασης στην ανθρώπινη υγεία (Dew et. al., 2005).

Οι φυτικές πολυφαινόλες, ποικίλουν για κάθε είδος φυτού και στα διάφορα μέρη του. Οι ταννίνες, οι λιγνίνες και τα φλαβονοειδή είναι υποκατηγορίες των πολυφαινολών.

α/α	Κατηγορία	Υποκατηγορία	Χημικοί Τύποι
1	Φλαβονοειδή	Φλαβονόλες	
		Φλαβανόλες	
		Ανθοκυανιδίνες	
2	Πολυφαινολικά οξέα	Υδροξυβενζοϊκό οξύ	
		Υδροξυκινναμικό οξύ	
3	Στιλβένια	<i>trans</i> -ρεσβερατρόλη	

Πίνακας 3 - Φυτικές Πολυφαινόλες

4.1.3 ΠΟΛΥΦΑΙΝΟΛΕΣ ΣΤΗΝ ΕΠΙΤΡΑΠΕΖΙΑ ΕΛΙΑ

Η συγκέντρωση πολυφαινολών στις επιτραπέζιες ελιές είναι υψηλή, φθάνοντας μέχρι 6% στην ξηρά ουσία και είναι εμφανώς υψηλότερη από ότι στο ελαιόλαδο. Οι πιο άφθονες πολυφαινόλες στην πρώτη ύλη είναι η ελευρωπαΐνη και

η υδροξυτυροσόλη και τα παράγωγά τους (αγλυκόνες της ελαιοευρωπαϊνης και λιγκοτροζίτη, διαλδεϋδικές και αποακετοξυ-μορφές των αγλυκονών), η οξική υδροξυτυροσόλη, λιγνάνες όπως η πινορεσινόλη, φαινολικά οξέα και τα φλαβονοειδή λουτεολίνη και απιγενίνη. Εντούτοις, οι ουσίες αυτές υδρολύονται κατά τη διάρκεια της επεξεργασίας με καυστικό νάτριο και της ζύμωσης και μετασχηματίζονται σε πιο απλές και σταθερές ουσίες. Όσο η μέθοδος επεξεργασίας απαιτεί περισσότερες πλύσεις με νερό (π.χ. ελιές μαυρισμένες με οξείδωση) ή διαλύματα (γεμισμένες ελιές), το ποσό των πολυφαινολών μειώνεται. Γενικά, οι επιτραπέζιες ελιές έχουν σημαντικές συγκεντρώσεις πολυφαινολών, περίπου 1200 mg/kg στις άμεσα συντηρημένες ελιές σε άλμη χρώματος στροφής (ξανθές), 500-700 mg/kg στις φυσικά μαύρες ελιές ή 1000 mg/kg στις ελιές Ισπανικού τύπου. Οι γεμιστές πράσινες ελιές έχουν μικρότερες συγκεντρώσεις λόγω των περισσότερων πλύσεων που εφαρμόζονται κατά την επεξεργασία του προϊόντος (Romero et al., 2004). Το περιεχόμενο των φαινολών στις ώριμες ελιές (μαυρισμένες με οξείδωση) είναι το χαμηλότερο. Τα κύρια φαινολικά συστατικά που ανευρίσκονται σε αυτόν τον τύπο ελιάς είναι η υδροξυτυροσόλη, η τυροσόλη, η ελευρωπαϊνή, η αγλυκόνη και ο ελευρω-11-μεθυλεστέρας. Κατά την διάρκεια αλλαγής χρώματος, μόνο η υδροξυτυροσόλη μειώνεται σημαντικά και τα άλατα για την αλλαγή του χρώματος δρουν ως καταλύτες σε αυτήν την διαδικασία υδρόλυσης (Marsilio et al., 2001). Εντούτοις, η περιεκτικότητα των πολυφαινολών στις επιτραπέζιες ελιές είναι σημαντική και για τον λόγο αυτό μπορεί να θεωρηθούν σημαντική πηγή αντιοξειδωτικών (Romero et al., 2004). Η ελαιοευρωπαϊνή και η υδροξυτυροσόλη είναι γνωστές και για τις αντιοξειδωτικές τους ιδιότητες, ενώ θεωρείται ότι δίνουν στο δέντρο της ελιάς αντοχή κατά των βλαβών από έντομα και βακτήρια. Η ελευρωπαϊνή, το πικρό σεκοϊριδοειδές συστατικό της ελιάς και του ελαιολάδου αποτελεί το κύριο πολυφαινολικό συστατικό της ελιάς με μεγάλη σημασία, γιατί συμβάλλει καθοριστικά στο χρώμα και τη γεύση του καρπού αυτού (Boskou, 1996 & Georgalaki et al., 1998) Έχει βρεθεί ότι στελέχη *Lactobacillus plantarum* υδρολύουν την ελευρωπαϊνή στις συντηρημένες σε άλμη ισπανικές ελιές μέσω της παραγωγής της β-γλυκοσιδάσης (Ciafardini et al., 1994). Η ελευρωπαϊνή έχει επίσης αντιοξειδωτικές και αντιφλεγμονώδεις ιδιότητες. Περιέχεται σε μεγάλη ποσότητα στα φύλλα της ελιάς (90 mg/g επί ξηρού βάρους), καθώς επίσης και σε όλα τα μέρη

του δένδρου (βλαστός, κορμός, κλπ) (Servili et al., (1996). Από θρεπτική άποψη αυτή η ένωση παρουσιάζει πολυάριθμες ενδιαφέρουσες ιδιότητες. Επιπλέον, μπορεί να ασκήσει χαρακτηριστική επίδραση στη ζύμωση των επιτραπέζιων ελιών, δεδομένου ότι έχει ανασταλτική επίδραση στη δράση των βακτηρίων. Από τις φαινόλες αυτές έχει μελετηθεί κυρίως η υδροξυτυροσώλη (3,4-διυδροξυφαινολαιθανόλη), η οποία, είναι μία από τις πιο σημαντικές φαινόλες και έχει την ικανότητα να προστατεύει από οξείδωση τις πρωτεΐνες χαμηλής πυκνότητας, το DNA από οξειδωτικές αλλοιώσεις και γενικά να δρα ως αποσβέστης ριζών και ενεργών ειδών οξυγόνου και αζώτου. Η υδροξυτυροσώλη είναι η φαινολική ένωση με την υψηλότερη συγκέντρωση στο χυμό των επιτραπέζιων ελιών και κυμαίνεται μεταξύ 3400 και 7500 $\mu\text{mol/l}$, ανάλογα με το σύστημα επεξεργασίας, την ποικιλία, το εμπορικό προϊόν, κλπ. Μεταξύ των ποικιλιών, η Manzanilla είναι η πλουσιότερη και ακολουθούν οι Hojiblanca και Gordal. Η υδροξυ-τυροσώλη είναι φαινολική ουσία με αντι-οξειδωτική δράση που προέρχεται από την ενζυματική διάσπαση της ελευρωπαΐνης. Η δράση των παραπάνω ουσιών στην εξουδετέρωση των ελευθέρων ριζών είναι μεγαλύτερη από το εμπορικό συντηρητικό 3,5-di-tert-butyl-4-hydroxytoluene (BHT) ή από τη βιταμίνη C (Visioli et al., 1995). Τα φλαβονοειδή, όπως η τυροσώλη και η υδροξυ-τυροσώλη, είναι ισχυρότερα αντιοξειδωτικά ακόμα και από το συνδυασμό των βιταμινών C και E. Στον ελαιόκαρπο βρίσκονται φαινολικά οξέα, φλαβονοειδή και σεκοϊριδοΐδιο (secoiridoids), με τις φαινολικές ενώσεις να αντιπροσωπεύουν ποσοστό 1-3% (β/ο) (Brenes et al., 1999). Στα φύλλα, το 19% (β/β) είναι ελευρωπαΐνη και το 1,8% φλαβονοειδή (Le Tutour et al., (1992). Η τυροσώλη είναι η δεύτερη αφθονότερη φαινόλη στις επιτραπέζιες ελιές με αρκετά υψηλή συγκέντρωση (750-1300 $\mu\text{mol/litre}$). Η εξέλιξή της είναι παράλληλη με αυτή της υδροξυτυροσώλης. Όλα τα πιο πάνω συστατικά παρουσιάζουν αντιμικροβιακή δράση. Σημαντικότερη όμως είναι η δράση των φλαβονοειδών. Παρόμοια αντιμικροβιακή δράση με τα φλαβονοειδή, έχει βρεθεί και σε εκχυλίσματα από ελιές, κυρίως πράσινες. Συγκεκριμένα η αντιμικροβιακή δράση του εκχυλίσματος της ελιάς, έχει μελετηθεί κυρίως από τους Fleming και συνεργάτες (1969). Ειδικά η αντιμικροβιακή αυτή δράση στους *Lactobacillus plantarum*, *Leuconostoc mesenteroides* και στους παθογόνους *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus* (Juven and Henis 1970 & Paster et al, 1988 & Nychas et al, 1990) έχει

αποδοθεί στην ελευρωπαϊνή, και στα προϊόντα διάσπασής της. Ειδικότερα η ζύμωση της ελιάς που επιτυγχάνεται με τα είδη *Lactobacillus* spp., είναι γνωστό ότι παρεμποδίζεται από τις φαινολικές ουσίες της ελιάς. Η συγκεκριμένη παρεμπόδιση έχει αποδοθεί σε τουλάχιστον έξι φαινολικές ουσίες που εκχυλίζονται από πράσινες ελιές με οξικό αιθυλεστέρα (Fleming et al. 1969, 1973). Αυτές οι ουσίες περιλαμβάνουν τον φαινολικό γλυκοζίτη της ελευρωπαϊνής και τα προϊόντα υδρόλυσής της, την β-3,4-διυδροξυφαινολαιθανόλη, το ελενολικό οξύ και το άγλυκο της ελευρωπαϊνής. Τέτοιου είδους εκχυλίσματα έχει αποδειχθεί ότι παρεμποδίζουν την αύξηση ενός αριθμού, κυρίως Gram αρνητικών, βακτηρίων (Fleming et al. 1973, Garrido-Fernandez & Vaughn 1978) καθώς και μερικούς μύκητες (Gourama & Bullerman, 1987). Επιπλέον, οι Τάσσου και συνεργάτες (1990), έδειξαν ότι η ελευρωπαϊνή παρεμπόδισε την εκβλάστηση των σπορίων του *Bacillus cereus*. Πράγματι, η παρουσία τέτοιων παρεμποδιστικών ουσιών στα απόνερα ελαιουργείων (Vazquez-Roncero et al., 1974), μπορεί να επηρεάζει τη μικροχλωρίδα, ιδιαίτερα τα αερόβια σποριογόνα βακτήρια του εδάφους όπου ρίχνονται τα απόνερα, με αποτέλεσμα τη μόλυνση των υδάτινων πόρων (θαλάσσιων και μη) των χωρών της Μεσογείου. Η ελευρωπαϊνή είναι ικανή να μειώσει κατά 80% την παραγωγή αφλατοξίνης από μύκητες. Την ίδια δράση παρουσιάζουν και άλλα συστατικά που βρέθηκαν σε εκχυλίσματα που λήφθηκαν από ελιές. Εκτός από την ελευρωπαϊνή, σημαντική δράση παρουσιάζουν και τα προϊόντα υδρόλυσής της (Nychas, 1995), όπως παρουσιάζεται και στον πίνακα 3.1. Οι Gourama και συνεργάτες, παρατήρησαν ότι ενώ η ίδια η ελευρωπαϊνή δεν παρεμπόδισε σημαντικά την ανάπτυξη στελεχών από *Penicillium* και *Aspergillus*, σημαντική αντιμικροβιακή δράση παρουσίασε η τυροσόλη, προϊόν υδρόλυσης της ελευρωπαϊνής.

Βακτήρια	Ελευρωπαϊνή	Άγλυκο	Αιθανολικό οξύ	Διύδροξυ- φαινολ- αιθανόλη	Μέθυλο- μέθυλ ελενολικό

<i>Lactobacillus plantarum</i>	-	+	+	-	-
<i>Pediococcus cerevisiae</i>	-	+	+	-	-
<i>Lactobacillus brevis</i>	-	+	+	-	-
<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	-	+	+	-	-

Πίνακας 2 - Πηγή : Nychas,1995

4.1.4. ΠΟΛΥΦΑΙΝΟΛΕΣ ΥΓΡΩΝ ΑΠΟΒΛΗΤΩΝ ΕΛΑΙΟΥΡΓΕΙΩΝ

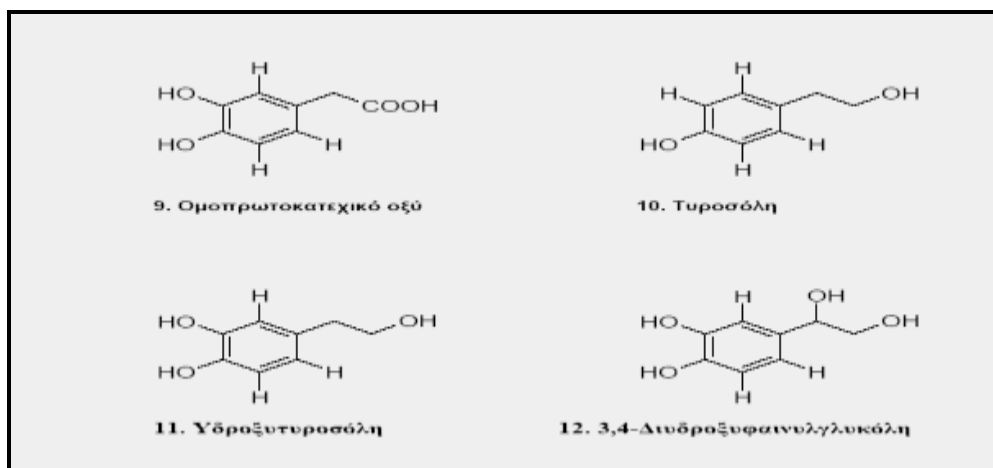
Η τοξικότητα και η ισχυρή αντιοξειδωτική δράση των αποβλήτων, αφορά στη συγκέντρωση των φαινολών, συστατικά που προκαλούν δύσκολη αποικοδόμηση (Mekki A. et.al., 2007).

Στο λάδι και στα υγρά απόβλητα των ελαιουργείων οι φαινολικές ενώσεις που υπάρχουν, χαρακτηρίζονται ως πολυφαινόλες. Αυτός ο όρος έχει καθιερωθεί, χωρίς να σημαίνει ότι όλες οι φαινόλες είναι αρωματικοί υδρογονάνθρακες με περισσότερες από 2 υδροξυλομάδες. Για παράδειγμα το κινναμικό οξύ, το ελενολικό οξύ, το σικιμικό οξύ και το κουϊνικό οξύ, φέρονται ως φαινολικά οξέα, παρόλο που βρίσκεται ένας αρωματικός δακτύλιος ή μία υδροξυλομάδα.

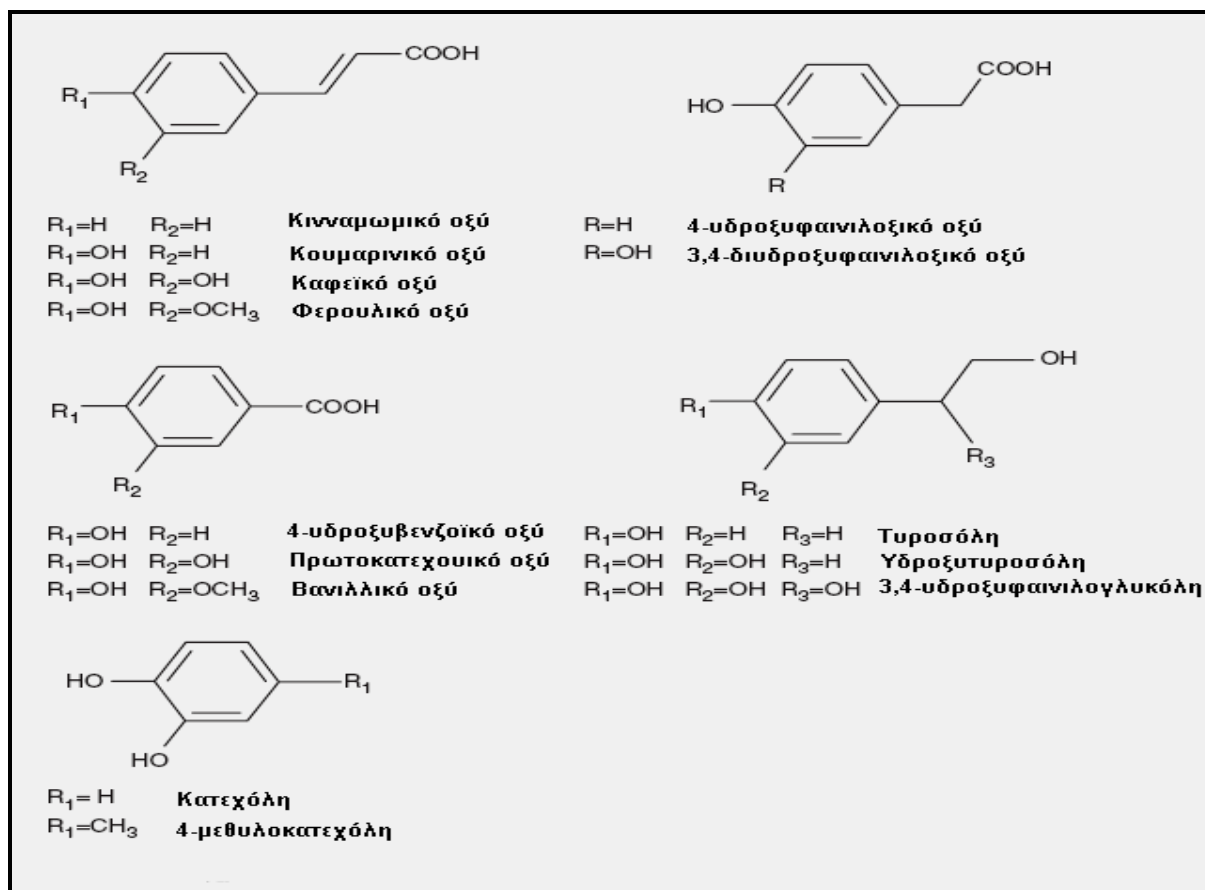
Κατά την διάρκεια της αποθήκευσης του ελαιοκάρπου μειώνεται η συγκέντρωση πολυφαινολών λόγω οξειδωτικών και υδρολυτικών διαδικασιών. Λόγω της υδατοδιαλυτότητας των πρωτεϊνών και των πολυσακχαριτών, κατά την παραγωγή ελαιόλαδου, επηρεάζουν τις φαινολικές ενώσεις με μερική διάλυση, όπου στη συνέχεια απομακρύνονται με τα απόνερα. (Tsimidou, M., et.al, 1992).

Η Τυροσώλη και η Υδροξυτυροσώλη, είναι τα κύρια φαινολικά συστατικά που βρίσκονται στο ελαιόλαδο. Υπάρχουν και άλλα φαινολικά συστατικά που βρίσκονται στο ελαιόλαδο όπως ελαιοευροπαίνη, καφεϊκό οξύ, βανιλλικό οξύ, συριγγικό οξύ, κουμαρικό οξύ, φερουλικό οξύ, σιναπικό οξύ, p-υδροξυβενζοϊκό οξύ, πρωτοκατεχικό οξύ, γαλλικό οξύ, γεντιστικό οξύ, σικιμικό οξύ, p-φαινυλοξικό και οι ενώσεις θυμόλη, καρβακρόλη και οι φλαβονοειδείς ενώσεις καμφερόλη, απιγενίνη και κερκετίνη.

Οι φαινολικές ενώσεις που υπάρχουν στον κατσίγαρο είναι τα φαινολικά οξέα, τα φλαβονοειδή και οι φαινολικές αλκοόλες.



Εικόνα 9 - Οι Φαινολικές Ενώσεις που Υπάρχουν στον Κατσίγαρο



Εικόνα 10 - Κυριότερες Φαινολικές Ενώσεις που Συναντώνται στα Απόβλητα Ελαιοτριβείων (Niaounakis & Halvadakis, 2006)

Η Υδροxyτυροσόλη, είναι αποδεδειγμένα η πολυφαινόλη με το υψηλότερο επίπεδο προστασίας, έναντι των ελευθέρων ριζών που έχει ποτέ αναφερθεί, για τα φυσικά αντιοξειδωτικά.

4.1.5 ΜΕΘΟΔΟΙ ΕΞΑΓΩΓΗΣ ΦΑΙΝΟΛΙΚΩΝ ΕΝΩΣΕΩΝ

Εδώ και μερικά χρόνια, έχει εκδηλωθεί ένα τεράστιο ενδιαφέρον, που αφορά στην εξαγωγή – εκχύλιση των πολυφαινολικών ενώσεων. Πρέπει να αναφερθεί πως δεν υπάρχει κάποια ενιαία και τυποποιημένη μέθοδος. Οι πλέον κοινές είναι:

- *Η εκχύλιση με διαλύτη.* (Baydar, et.al., 2004 – Bucic, et.al., 2007) και
- *Η εκχύλιση με υπερκρίσιμο ρευστό.* (Bleve et al, 2008. Nahar & Sarker, 2005. Palma & Taylor, 1999).

Εκχύλιση Υγρού – Υγρού.

Η εκχύλιση υγρού-υγρού είναι μία λειτουργία μεταφοράς μάζας, στην οποία ένα υγρό διάλυμα, που αρχικά περιέχει μία ή περισσότερες διαλυτές ουσίες, αναμιγνύεται καλώς με ένα υγρό (διαλύτης) . Ο διαλύτης, παρουσιάζει καλύτερη επιλεκτικότητα προς ένα ή και περισσότερα από τα συστατικά του διαλύματος. Από αυτή την διαδικασία προκύπτουν δύο προϊόντα:

- Το εκχύλισμα, που περιέχει το επιθυμητό εξαγόμενο διάλυμα και
- Το ραφινρισμένο, που περιέχει το υπόλοιπο διάλυμα, με μικρή ποσότητα διαλυμένης ουσίας.

Αυτή η εκχύλιση, λειτουργεί πολύ καλά, εάν επιλεγεί ο κατάλληλος διαλύτης.

Εκχύλιση Στερεού – Υγρού.

Η Εκχύλιση Στερεού – Υγρού ή έκπλυση, μπορεί να οριστεί ως ένα φαινόμενο μεταφοράς μάζας, κατά το οποίο κάποια στερεά μόρια, αρχίζουν να αποχωρούν από την αρχική τους θέση και να κινούνται μέσα σε ένα διαλύτη, όταν αυτός ο διαλύτης έρθει σε επαφή με το στερεό.

Αυτό το φαινόμενο μεταφοράς της μάζας, μπορεί να ενισχυθεί με αλλαγές στην συγκέντρωση, στον συντελεστή μεταφοράς (*diffusion coefficient*- m^2/s) και στο οριακό στρώμα (*boundary layer*). (Corrales, et.al., 2009). Αυτή η λειτουργία, χρησιμοποιείται ευρέως για ανάκτηση σπουδαίων συστατικών των τροφίμων, όπως φυσιικά και αυτών των πολυφαινολικών συστατικών.

5. ΕΛΕΥΘΕΡΕΣ ΡΙΖΕΣ

Τα μόρια αποτελούνται από έναν ή περισσότερους ατομικούς πυρήνες οι οποίοι περιβάλλονται από ηλεκτρόνια τα οποία περιφέρονται γύρω από τον πυρήνα. Τα ηλεκτρόνια είναι διευθετημένα σε έναν αριθμό τροχιακών, τα οποία βρίσκονται σε διαφορετικές αποστάσεις από τον πυρήνα. Στα περισσότερα μόρια τα ηλεκτρόνια που βρίσκονται σε κάθε τροχιακό ζευγαρώνουν με ένα άλλο ηλεκτρόνιο. Τα δύο ηλεκτρόνια κάθε ζεύγους περιστρέφονται γύρω από τον εαυτό τους (*spin*) σε αντίθετες κατευθύνσεις. Τα ζευγαρωμένα ηλεκτρόνια διατηρούν το μόριο σχετικά σταθερό -σε μικρότερη ενεργειακή κατάσταση- και ως εκ τούτου λιγότερο δραστικό. Όταν ένα ή περισσότερα ηλεκτρόνια, ιδιαίτερα αυτά που βρίσκονται στα εξωτερικά τροχιακά του ατόμου, είναι ασύζευκτα, δεν έχουν δηλαδή ζευγάρι, τότε το μόριο γίνεται ασταθές -σε μεγαλύτερη ενεργειακή κατάσταση- και συνεπώς πιο δραστικό από άλλα μόρια. Άτομα ή μόρια με ασύζευκτα ηλεκτρόνια ονομάζονται παραμαγνητικά, ενώ όταν δεν διαθέτουν τέτοια ηλεκτρόνια, διαμαγνητικά. Ένα ασύζευκτο ηλεκτρόνιο έχει τεράστια έλξη στα ηλεκτρόνια γειτονικών ατόμων με αποτέλεσμα την πρόκληση χημικών αντιδράσεων μεταξύ ατόμων ή μορίων, κατά τις οποίες έχουμε μεταφορά ηλεκτρονίων. Οι αντιδράσεις αυτές λέγονται οξειδοαναγωγικές (*redox*). Κατά την οξείδωση έχουμε απώλεια ηλεκτρονίων, ενώ κατά την αναγωγή έχουμε απόκτηση ηλεκτρονίων από ένα άτομο. Πολύ γνωστό μας παράδειγμα οξειδοαναγωγικής αντίδρασης αποτελεί η οξείδωση των μετάλλων από το οξυγόνο της ατμόσφαιρας, το γνωστό σκούριασμα. Ένα άτομο ή μόριο με ένα ή περισσότερα ασύζευκτα ηλεκτρόνια και ανεξάρτητη παρουσία λέγεται ελεύθερη ρίζα και συμμετέχει πολύ εύκολα σε αντιδράσεις οξειδοαναγωγής με γειτονικά

μόρια. Κατά τις αντιδράσεις αυτές όχι μόνο μεταβάλλονται σημαντικά τα γειτονικά μόρια στόχοι, αλλά μερικές φορές μεταβιβάζονται τα ασύζευκτα ηλεκτρόνια από στόχο σε στόχο, δημιουργώντας έτσι μία δεύτερη, τρίτη κ.ο.κ. ελεύθερη ρίζα υπό μορφή αλυσιδωτής αντίδρασης. Η πολύ μεγάλη βλαπτική επίδραση των ελευθέρων ριζών οφείλεται ακριβώς στον πολλαπλασιασμό των μεταβολών που προκαλούνται από παρόμοιες αλυσιδωτές αντιδράσεις.

Οι πλέον σημαντικές ελεύθερες ρίζες είναι μοριακά είδη με κέντρο το οξυγόνο και μερικές φορές το άζωτο ή τον άνθρακα. Το ίδιο το οξυγόνο που αναπνέουμε αποτελεί μία ελεύθερη ρίζα, αφού περιέχει δύο ασύζευκτα ηλεκτρόνια που βρίσκονται σε δύο διαφορετικά τροχιακά. Η μορφή όμως αυτή του O_2 , που λέγεται οξυγόνο τριπλής κατάστασης (triplet state) και συμβολίζεται με 3O_2 , δεν είναι ιδιαίτερα δραστικό. Το μοριακό όμως αυτό οξυγόνο μπορεί να ενεργοποιηθεί, έτσι ώστε τα δύο ηλεκτρόνια να βρεθούν στο ίδιο τροχιακό. Η πολύ δραστική αυτή μορφή οξυγόνου ονομάζεται οξυγόνο μονής κατάστασης (singlet state) και συμβολίζεται με 1O_2 . Αν και το οξυγόνο μονής κατάστασης δεν αποτελεί ελεύθερη ρίζα, τα ηλεκτρόνια του βρίσκονται σε διεγερμένη κατάσταση, δηλαδή είναι πολύ δραστικά και ως εκ τούτου μπορεί να προκαλέσουν βλαπτικές αντιδράσεις παρόμοιες με αυτές των ελευθέρων ριζών οξυγόνου. Παρόμοιο μόριο το οποίο δεν είναι ελεύθερη ρίζα αλλά περιέχει δραστικό οξυγόνο αποτελεί και το υπεροξείδιο του υδρογόνου. Συνολικά όλα τα μοριακά είδη που περιλαμβάνουν οξυγόνο, είτε είναι ελεύθερες ρίζες είτε όχι, ονομάζονται **δραστικά είδη οξυγόνου (ΔΕΟ)**. Τα κυριότερα ΔΕΟ είναι: η ρίζα σουπεροξειδίου (O_2^-), η ρίζα υδροξυλίου (OH), η ρίζα υπεροξειδίου (ROO), το O_2 απλής κατάστασης, το υπεροξείδιο του υδρογόνου (H_2O_2) και το υποχλωριώδες οξύ (HOCl). Στα δραστικά αυτά μοριακά είδη συμπεριλαμβάνεται επίσης και η δραστική μορφή αζώτου, το μονοξείδιο του αζώτου (NO), το οποίο είναι ελεύθερη ρίζα (με τελεία συμβολίζεται η ελεύθερη ρίζα, ενώ με (-) συμβολίζεται το αρνητικό φορτίο της ρίζας και με R, ένα άτομο ή μία ομάδα ατόμων, κυρίως αλυσίδα ατόμων άνθρακα).

5.1 ΠΩΣ ΔΗΜΙΟΥΡΓΟΥΝΤΑΙ ΟΙ ΕΛΕΥΘΕΡΕΣ ΡΙΖΕΣ ΣΤΟΝ ΟΡΓΑΝΙΣΜΟ ΜΑΣ

Ελεύθερες ρίζες δημιουργούνται στον οργανισμό μας είτε από φυσιολογικές διαδικασίες του είτε από εξωτερικές πηγές.

Οι κυριότερες από τις φυσιολογικές διαδικασίες παραγωγής ελευθέρων ριζών περιλαμβάνουν:

- (α) Την παραγωγή ελευθέρων ριζών σουπεροξειδίου, ως παραπροϊόν ή «χημικό ατύχημα» κατά τη λειτουργία της αναπνευστικής αλυσίδας των μιτοχονδρίων των κυττάρων. Κατά τη διαδικασία αυτή ορισμένα ηλεκτρόνια ξεφεύγουν από τα μόρια που μεταφέρουν τα ηλεκτρόνια στην αναπνευστική αλυσίδα και περνούν στο οξυγόνο ανάγοντας το σε σουπεροξείδιο.
- (β) Τη φυσιολογική δράση οξειδωτικών ενζύμων όπως, οι λιποξυγονάσες, οι κυκλοοξυγονάσες, οι υπεροξειδάσες και οι αφυδρογονάσες κατά την οποία παράγονται ελεύθερες ρίζες ως παραπροϊόντα των ενζυμικών αντιδράσεων.
- (γ) Την παραγωγή ελευθέρων ριζών υδροξυλίου, οι οποίες είναι και οι πλέον δραστικές, με χημικές αντιδράσεις παρουσία μεταλλικών ιόντων.
- (δ) Την παραγωγή ελευθέρων ριζών ως μέρος της λειτουργίας του ανοσοποιητικού συστήματος. Ορισμένα από τα κύτταρα του συστήματος αυτού παράγουν ελεύθερες ρίζες για να εξουδετερώσουν βακτήρια εισβολείς. Σε περιπτώσεις που η διαδικασία αυτή είναι εκτός ελέγχου, όπως συμβαίνει με τις αυτοάνοσες ασθένειες, μερικές ελεύθερες ρίζες που παράγονται προκαλούν βλάβες στα ίδια μας τα κύτταρα.

Ένας αριθμός παραγόντων που βρίσκεται εκτός του σώματος μας μπορεί επίσης να αποτελέσει πηγή παραγωγής ελευθέρων ριζών από τη στιγμή που θα έρθει σε επαφή με το σώμα μας. Μερικά παραδείγματα τέτοιων πηγών αποτελούν ο καπνός του τσιγάρου, οι ακτίνες-X, η υπεριώδης ακτινοβολία, διάφορες χημικές ενώσεις και φάρμακα καθώς επίσης το νέφος της ατμοσφαιρικής ρύπανσης (όζον, νιτροξείδια).

5.2 ΠΩΣ ΕΞΟΥΔΕΤΕΡΩΝΟΝΤΑΙ ΤΑ ΔΕΟ ΣΤΟΝ ΟΡΓΑΝΙΣΜΟ ΜΑΣ

Σε κάθε βιολογικό σύστημα πρέπει να διατηρείται η ισορροπία μεταξύ του σχηματισμού και της απομάκρυνσης των ΔΕΟ. Έχει υπολογισθεί ότι περίπου 10.000 ελεύθερες ρίζες τη μέρα «Βομβαρδίζουν» κάθε κύτταρο μας. Η αύξηση των οξειδώσεων από τα ΔΕΟ οδηγεί τα κύτταρα σε μία κατάσταση που λέγεται **οξειδωτικό** στρες και είναι παράγοντας πρόκλησης ασθενειών. Λόγω της συνεχούς έκθεσης σε ΔΕΟ και για την πρόληψη του οξειδωτικού στρες, ο οργανισμός μας, όπως όλα τα φυτά και τα ζώα, έχει αναπτύξει για προστασία διάφορους αντιοξειδωτικούς μηχανισμούς στους οποίους παίρνουν μέρος αντιοξειδωτικές ουσίες. Γενικά χαρακτηρίζουμε ως **αντιοξειδωτική** ουσία κάθε ουσία η οποία βρίσκεται σε μικρές συγκεντρώσεις σε σύγκριση με το υπόστρωμα που οξειδώνεται και η οποία καθυστερεί σημαντικά ή αποτρέπει την οξείδωση του υποστρώματος αυτού. Τα αντιοξειδωτικά γενικά λειτουργούν με δύο τρόπους: (1) είτε παρεμποδίζουν τη δημιουργία ΔΕΟ, (2) είτε σταματούν τη διάδοση των ελεύθερων ριζών που προκαλείται από τις αλυσιδωτές αντιδράσεις. Επίσης είναι δυνατόν η παρουσία κάποιου αντιοξειδωτικού (για παράδειγμα της βιταμίνης C) να συμβάλλει στη διατήρηση της αντιοξειδωτικής δράσης κάποιου άλλου αντιοξειδωτικού, όπως της τοκοφερόλης. Στην περίπτωση αυτή έχουμε συνεργατική δράση των δύο αντιοξειδωτικών και λέμε ότι η βιταμίνη C έχει **συναντιοξειδωτική** δράση.

Μπορούμε επίσης να διαφοροποιήσουμε τα αντιοξειδωτικά ανάλογα με την προέλευση τους και τη χημική τους σύσταση. Έτσι υπάρχουν ενδογενείς αντιοξειδωτικές ουσίες και αντιοξειδωτικά τα οποία προσλαμβάνει ο οργανισμός μας με την τροφή. Τα ενδογενή αντιοξειδωτικά διακρίνονται σε ουσίες: (α) μεγάλου Μοριακού Βάρους (MB) και (β) μικρού MB. Στην πρώτη κατηγορία περιλαμβάνονται ένζυμα, όπως η δισμουτάση του υπεροξειδίου, η καταλάση, η υπεροξειδάση της γλουταθειόνης, η παραοξονάση και το πρωτεόσωμα τα οποία ελαττώνουν τη δημιουργία ΔΕΟ μέσω της απομάκρυνσης δυνητικών οξειδωτικών ή μετατρέποντας ΔΕΟ σε σχετικά σταθερές χημικές ενώσεις. Στην κατηγορία αυτή περιλαμβάνονται επίσης διάφορες πρωτεΐνες του πλάσματος (αίμα) όπως η αλβουμίνη, η σερουλοπλασμίνη και η τρανσφερίνη, οι οποίες δεσμεύουν μεταλλικά ιόντα και ως

εκ τούτου περιορίζουν τη δημιουργία ελεύθερων ριζών μέσω αντιδράσεων που καταλύονται από μέταλλα. Τα μικρού MB ενδογενή αντιοξειδωτικά υποδιαιρούνται περαιτέρω σε λιποδιαλυτά αντιοξειδωτικά μικρά χημικά μόρια, όπως η τοκοφερόλη (βιταμίνη Ε), τα καροτενοειδή, η χολερυθρίνη, ορισμένες κινόνες και πολυφαινόλες και σε υδατοδιαλυτά μόρια, όπως το ασκορβικό οξύ (βιταμίνη C), το ουρικό οξύ και ορισμένες πολυφαινόλες.

Τα κυριότερα αντιοξειδωτικά της διατροφής αποτελούν λιποδιαλυτές και υδατοδιαλυτές φυτικές ενώσεις όπως η τοκοφερόλη, το β-καροτένιο, το λυκοπένιο, η βιταμίνη C, η λουτεΐνη και διάφορες πολυφαινόλες (φλαβονοειδή και άλλες ενώσεις).

5.3 ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΤΩΝ ΔΕΟ ΣΤΗΝ ΥΓΕΙΑ

Έχει γίνει πλέον επιστημονικά αποδεκτό ότι η παραβίαση της απαραίτητης οξειδοαναγωγικής ισορροπίας των κυττάρων μας προς την κατάσταση του οξειδωτικού στρες έχει ως αποτέλεσμα την εκδήλωση διαφόρων παθολογικών καταστάσεων ενώ επιπλέον συμμετέχει και στη διαδικασία της γήρανσης. Αυτό οφείλεται στο γεγονός ότι το οξειδωτικό στρες οδηγεί σε οξείδωση των βασικών βιοχημικών συστατικών του κυττάρου, όπως τα λιπίδια, οι πρωτεΐνες και το DNA με αποτέλεσμα τη μεταβολή των δομικών και λειτουργικών τους ιδιοτήτων. Ο κατάλογος των ασθενειών για τις οποίες έχουν ενοχοποιηθεί σε μεγαλύτερο ή μικρότερο βαθμό τα ΔΕΟ αυξάνεται συνεχώς και περιλαμβάνει καρδιαγγειακές παθήσεις, τον καρκίνο, νευροεκφυλιστικές ασθένειες, τον καταρράκτη, τον διαβήτη και διάφορες αυτοάνοσες ασθένειες.

Ένα παράδειγμα παθολογικής κατάστασης στη δημιουργία της οποίας συμμετέχουν καταλυτικά τα ΔΕΟ αποτελεί η αθηροσκλήρωση, η οποία αποτελεί και την κύρια αιτία θανάτου στον δυτικό κόσμο. Στο υποενδοθηλιακό περιβάλλον των αιμοφόρων αγγείων, τα ΔΕΟ οξειδώνουν τα σωματίδια της LDL (χαμηλής πυκνότητας λιποπρωτεΐνη). Τα ΔΕΟ αρχικά οξειδώνουν τα φωσφολιπίδια της LDL. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα τη συσσώρευση μονοκυττάρων στον υποενδοθηλιακό χώρο και τη

μετατροπή τους σε μακροφάγα κύτταρα. Στη συνέχεια έχουμε οξείδωση και της πρωτεΐνης της LDL, οπότε λέμε ότι η LDL είναι πλήρως οξειδωμένη. Η οξειδωμένη LDL μεταφέρεται στο εσωτερικό των μακροφάγων μέσω ειδικών υποδοχέων, 3-4 φορές ταχύτερα από τη μη-οξειδωμένη LDL, με αποτέλεσμα τη συσσώρευση μεγάλων ποσοτήτων οξειδωμένης LDL μέσα στα μακροφάγα, τα οποία μετατρέπονται έτσι σε αφρώδη κύτταρα. Καθώς τα αφρώδη κύτταρα συσσωρεύονται κάτω από το ενδοθήλιο έχουμε την έναρξη του σχηματισμού της αθηρωματικής πλάκας, η οποία και οδηγεί περαιτέρω στην κλινική εκδήλωση της νόσου.

6. ΣΚΟΠΟΣ

Σκοπός της παρούσας εργασίας ήταν η μελέτη της αντιοξειδωτικής δράσης πολυφαινολικού εκχυλίσματος τα οποία ήταν ενθυλακωμένα σε μαλτοδεξτρίνη, πρωτεΐνη τυρογάλακτος και ζελατίνη από απόβλητα ελαιοτριβείου για αύξηση της βιοδιαθεσιμότητας τους. Στο πρώτο στάδιο εξετάστηκε η αντιοξειδωτική ικανότητα των εκχυλισμάτων ύστερα από αλληλεπίδραση με τη ρίζα DPPH. Στο δεύτερο στάδιο εξετάστηκε η αναγωγική ικανότητα των ενθυλακωμένων σε μαλτοδεξτρίνη, πρωτεΐνη και ζελατίνη αποβλήτων η οποία και προσδιορίστηκε σύμφωνα με τη μέθοδο των Yen & Duh (1994).

7. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

7.1 ΕΚΧΥΛΙΣΜΑΤΑ

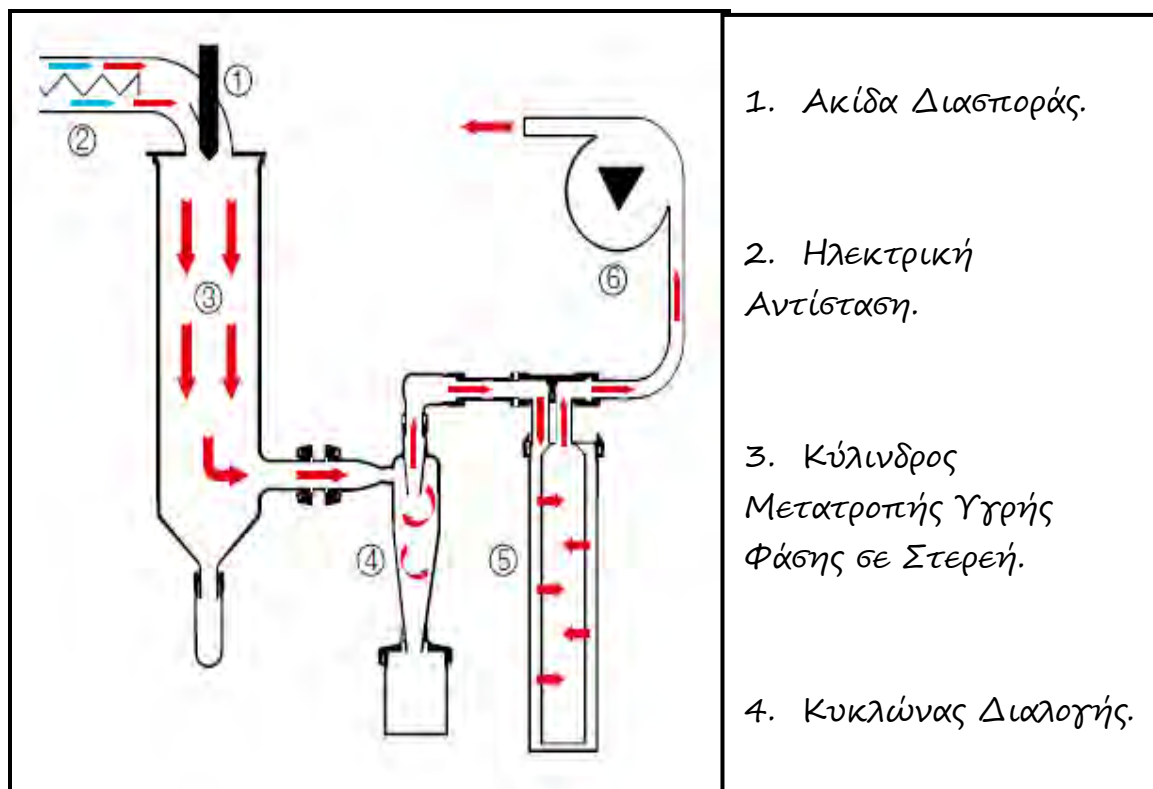
Γενικά

Η ξήρανση με ψεκασμό, όλων των διαλυμάτων που περιείχαν και τα επεξεργασμένα - (συμπυκνωμένα με αντίστροφη όσμωση – 14,1 Brix), απόβλητα ελαιοτριβείου, εκτελέστηκαν στην συσκευή Mini Spray Dryer B-290, που κατασκευάζεται από την εταιρεία Buchi.

Αρχή Λειτουργίας

Η λειτουργία περιγράφεται ως εξής: Το προς ξήρανση υγρό μεταφέρεται μέσω αγωγού, προς τον μεγάλο κύλινδρο, με δυνατότητα ελέγχου της ροής του. Πριν την είσοδό του στον κύλινδρο, θερμαίνεται από ηλεκτρική αντίσταση, που βρίσκεται πριν την ακίδα. Η ακίδα η οποία λειτουργεί με συμπιεσμένο αέρα, (μέσω του air compressor), μετατρέπει το διάλυμα σε λεπτά σταγονίδια. Στον μεγάλο κύλινδρο τα σταγονίδια μετατρέπονται σε στερεά σωματίδια. Όσα δεν μετατραπούν, στον πυθμένα εγκλωβίζονται από μία υγροπαγίδα. Κατόπιν, τα στερεά πλέον σωματίδια μεταφέρονται στον κυκλώνα, όπου γίνεται ο διαχωρισμός. Δηλαδή, στο δοχείο

συλλογής της ξήρανσης με ψεκασμό, συλλέγονται τα κατάλληλα στερεά σωματίδια, ενώ το υπόλοιπο υλικό περνάει από φίλτρο και μέρος αυτού επανατροφοδοτείται.



Εικόνα 11 - Σχηματική Παράσταση Ροής Υλικού στο Spray Dryer



Εικόνα 12 - Spray Dryer B-290 του Εργαστηρίου

Τεχνικά Χαρακτηριστικά του Mini Spray Dryer B-290

Ισχύς Λειτουργίας.	2.900 W.
Τάση και Συχνότητα Λειτουργίας.	220/230 V, 50-60 Hz.
Ικανότητα Εξάτμισης.	1,0 l/hr. Υψηλότερη για Οργανικούς Διαλύτες.
Ροή Αέρος.	35 m ³ /hr (max).
Μέγιστη Θερμοκρασία Εισόδου.	220°C.
Αντίσταση Θέρμανσης.	2.300 W.
Αέριο Ψεκασμού.	Συμπιεσμένος Αέρας ή Άζωτο 200 – 1000 l/hr , 5 – 8 bar.
Διάμετρος Ακίδας	0,7 mm.
Διάμετρος Σωματιδίων	1 – 25 μm.
Υλικά που Έρχονται σε Επαφή με το Προϊόν.	Ανοξείδωτος Χάλυβας Ανθεκτικός στην Οξείδωση. Βοριοπυριτικό Γυαλί με Πολύ Μικρό Συντελεστή Θερμικής Διαστολής. FPM (Fluoropolymer – Φθοροπολυμερή), τα οποία Χρησιμοποιούνται στις Βαλβίδες για την Μεταφορά των Βιομηχανικών Υγρών.

Πίνακας 3 - Τεχνικά Χαρακτηριστικά του Mini Spray Dryer B-290

Τα εκχυλίσματα απομονώθηκαν από το εργαστήριο Μηχανικών Βιοσυστημάτων με την βοήθεια του επίκουρου Καθηγητή Κωνσταντίνου Πετρωτού του ΤΕΙ Λάρισας του Τμήματος Μηχανικής Βιοσυστημάτων σύμφωνα με την παραπάνω διαδικασία. Στον παρακάτω πίνακα παρατίθενται ο αριθμός των δειγμάτων που μελετήθηκαν καθώς και οι συνθήκες ενθυλάκωσής τους.

<u>ΠΙΝΑΚΑΣ ΣΥΝΘΗΚΩΝ ΤΩΝ ΠΕΙΡΑΜΑΤΩΝ</u>					
ΑΡΙΘΜΟΣ	ASPIRATOR (%)	ΠΟΛΥΦΑΙΝΟΛΕΣ (ml)	ΠΡΩΤΕΙΝΗ (gr)	ΜΑΛΤΟΔΕΞΤΡΙΝΗ (gr)	ΖΕΛΑΤΙΝΗ (gr)
1	100	75	50		
2	100	37,5	25		
3	100	37,5	25		
4	100	37,5	25		
5	100	37,5	25		
6	100	37,5	25		
7	100	37,5	25		
8	100	37,5		25	
9	100	37,5		25	
10	100	37,5		25	
11	100	37,5		25	
12	100	37,5		25	
13	100	37,5		25	
14	100	37,5		25	
15	100	37,5		25	
16	100	37,5		25	
17	100	37,5	25		5
18	100	37,5		25	5
19	100	37,5		25	5
20	100	37,5	25		5
21	100	37,5		25	5
22	100	37,5	25		5
23	100	37,5		25	5
24	100	37,5	25		5

Πίνακας 4 - Αριθμός και συνθήκες ενθυλάκωσης πειραμάτων

7.1.2 ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΑ

Τα χημικά αντιδραστήρια 1,1-διφαινυλ-πικρυλδραζύλιο (1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl, DPPH^{*}). Το χημικό αντιδραστήριο Na₂SO₄ αποκτήθηκε από την εταιρεία Panreac, Chem-Lab NV., Zedelgen Belgium. Η μεθανόλη που χρησιμοποιήθηκε αποκτήθηκε από την εταιρεία J.T. Baker, UN1230, Deventer Holland. Τα χημικά αντιδραστήρια NaH₂PO₄, Na₂HPO₄, Tris (tris(hydroxymethyl)aminomethane) και TCA (trichloroacetic acid) αποκτήθηκαν από την εταιρεία MERCK, Darmstadt F.R. Germany.

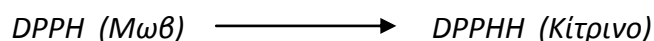
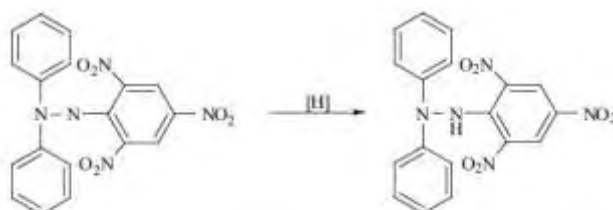
Για τους φωτομετρικούς προσδιορισμούς χρησιμοποιήθηκε το φωτόμετρο HITACHI U-1500.

7.1.3 ΕΚΤΙΜΗΣΗ ΤΗΣ ΑΝΤΙΟΞΕΙΔΩΤΙΚΗΣ ΙΚΑΝΟΤΗΤΑΣ ΜΕΣΩ ΑΛΛΗΛΕΠΙΔΡΑΣΗΣ ΜΕ ΤΗΝ ΡΙΖΑ DPPH^{*}

Αρχή της μεθόδου

Η μέθοδος παρουσιάστηκε το 1995 από τους Brand-Williams et al. Ανήκει στις ευρέως χρησιμοποιούμενες μεθόδους για την εκτίμηση αντιοξειδωτικής ικανότητας φυτικών δειγμάτων (Brand-Williams et al, 1995). Η μέθοδος χρησιμοποιείται για την εκτίμηση της αντιοξειδωτικής ικανότητας, βασιζόμενη στην ικανότητα αλληλεπίδρασης των αντιοξειδωτικών μορίων με την σταθερή αζωτούχα ρίζα 1,1 διφαινυλ-2πικρυλδραζύλιο (DPPH). Η ρίζα DPPH^{*} μπορεί να αδρανοποιηθεί, είτε μέσω προσθήκης ενός ηλεκτρονίου (single electron transfer, SET) είτε μέσω προσθήκης ενός ατόμου υδρογόνου (hydrogen atom transfer, HAT) (Prior et al., 2005). Η 1,1 διφαινυλ-2-πικρυλδραζύλιο (DPPH^{*}) είναι μία σταθερή ρίζα, φέρει μωβ χρώμα και απορροφά στα 517nm. Όταν προστεθεί μια ουσία με αντιοξειδωτική δράση τότε η ρίζα 1,1 διφαινυλ-2-πικρυλδραζύλιο (DPPH^{*}) ανάγεται, και μετατρέπεται σε 1,1-διφαινυλ-2-πικρυλδραζίνη (DPPH:H), όπως φαίνεται παρακάτω (Εικόνα 16). Η αναγωγή της ρίζας έχει σαν αποτέλεσμα, την

μεταβολή του χρώματος του διαλύματος, από μωβ σε κίτρινο, μεταβολή, που είναι ανάλογη της συγκέντρωσης της αντιοξειδωτικής ουσίας και την αντίστοιχη μείωση της οπτικής απορρόφησης στα 517nm. Η μεταβολή της απορρόφησης προσδιορίζεται φωτομετρικά.



Εικόνα 13 - Η αναγωγή του DPPH^{\bullet} σε DPPH:H

7.1.4 Πειραματική διαδικασία

Αρχικά προετοιμάζεται το διάλυμα DPPH^{\bullet} την ημέρα του πειράματος και καλύπτεται με αλουμινόχαρτο γιατί είναι φωτοευαίσθητο (1000 μl μεθανόλης στο οποίο εμπεριέχονται 100 μM ρίζας DPPH^{\bullet}) και ακολουθεί η προετοιμασία των διαλυμάτων των εξεταζόμενων εκχυλισμάτων σε διάφορες συγκεντρώσεις (πχ. 5, 10, 25, 50, 100 $\mu\text{g/ml}$). Ο συνολικός όγκος της αντίδρασης είναι 1000 μl . Η διάλυση των δειγμάτων έγινε με απεσταγμένο νερό. Πρώτα προστίθενται τα διαλύματα της εξεταζόμενης ουσίας, μετά η μεθανόλη και τέλος το διάλυμα της ρίζας (100 μM ρίζας DPPH^{\bullet}) με σταθερό γρήγορο ρυθμό, όπως φαίνεται στον παρακάτω πίνακα (Πίνακας 10). Ακολουθεί ανάδευση και επώαση των δειγμάτων στο σκοτάδι για 20 min, σε θερμοκρασία δωματίου. Μετά την επώαση ακολουθεί μέτρηση της απορρόφησης στα 517nm. Η φασματοφωτομέτρηση έγινε με συσκευή Hitachi U-1500 σε πλαστικές κυψελίδες του 1ml. Ο μηδενισμός του φασματοφωτόμετρου γίνεται με 1 mL μεθανόλης (τυφλό). Τα δείγματα που περιείχαν μόνο μεθανόλη και DPPH αποτελούσαν τους θετικούς μάρτυρες. Επειδή υπάρχει πιθανότητα η ίδια η εξεταζόμενη ουσία να απορροφά στα 517nm, μετράται και η απορρόφηση της κάθε

εξεταζόμενης συγκέντρωσης σε μεθανόλη (Πίνακας 11). Όλα τα δείγματα εξετάζονται εις τριπλούν, με τουλάχιστον δύο πειράματα για το κάθε φυτικό εκχύλισμα ενώ το διάλυμα της ρίζας DPPH[•] σε μεθανόλη χρησιμοποιείται σαν δείγμα ελέγχου (control).

	Τυφλό	Control	C1	C2	C3	C4	C5
Εκχύλισμα	-	-	50μl	50μl	50μl	50μl	50μl
Μεθανόλη	950μl	900μl	900μl	900μl	900μl	900μl	900μl
H ₂ O	50 μl	50μl					
DPPH [•]	-	50μl	50μl	50μl	50μl	50μl	50μl
V τελ	1ml	1ml	1ml	1ml	1ml	1ml	1ml

Πίνακας 5 - Η διαδοχική σειρά προσθήκης και οι ποσότητες των αντιδραστηρίων

	Τυφλό	Control	C1	C2	C3	C4	C5
Εκχύλισμα	-	-	50μl	50μl	50μl	50μl	50μl
Μεθανόλη	950μl	900μl	950μl	950μl	950μl	950μl	950μl
H ₂ O	50 μl	50μl					
V τελ	1ml	1ml	1ml	1ml	1ml	1ml	1ml

Πίνακας 6 - Έλεγχος απορρόφησης της κάθε εξεταζόμενης συγκέντρωσης σε μεθανόλη

Υπολογισμός της αντιοξειδωτικής ικανότητας-Στατιστική ανάλυση

Για την στατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων υπολογίστηκε η μέση τιμή και η τυπική απόκλιση των τιμών της απορρόφησης για κάθε δείγμα στα 517nm. Η αντιοξειδωτική ικανότητα κάθε εξεταζόμενης ουσίας υπολογίστηκε ως το ποσοστό αναστολής της δράσης της ρίζας DPPH και εκφράστηκε σαν το ποσοστό εξουδετέρωσης αυτής σύμφωνα με τον τύπο:

$$\% \text{ εξουδετέρωση της ρίζας DPPH} = [(A_0 - A_s) / A_0] \times 100$$

όπου:

A_0 : Μέση τιμή της οπτικής απορρόφησης του δείγματος ελέγχου.

A_s : Μέση τιμή της οπτικής απορρόφησης του δείγματος (φυτικό εκχύλισμα).

Για να προσδιοριστεί αν υπήρχαν στατιστικά σημαντικά διαφορές μεταξύ των μέσων τιμών χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος one-way ANOVA σε συνδυασμό με το τεστ του Dunnett (οι υπολογισμοί έγιναν με το πρόγραμμα SPSS 18.0). Επίσης, εκτιμήθηκε στατιστικά η συσχέτιση μεταξύ της εξουδετέρωσης της ρίζας του DPPH που προκαλούσαν οι εξεταζόμενες ουσίες και της συγκέντρωσής τους με τον προσδιορισμό του συντελεστή συσχέτισης r κατά Spearman.

Επιπλέον, προσδιορίστηκε το IC_{50} , δηλαδή η συγκέντρωση των εξεταζόμενων ουσιών στην οποία προκαλούσαν μείωση των ριζών του DPPH κατά 50%, από τις γραφικές παραστάσεις της μεταβολής της % εξουδετέρωσης σε συνάρτηση με τις συγκεντρώσεις των εκχυλισμάτων. Όσο μικρότερη είναι η τιμή του IC_{50} τόσο ισχυρότερη είναι η αντιοξειδωτική δράση του εκχυλίσματος.

7.2 ΕΚΤΙΜΗΣΗ ΤΗΣ ΑΝΑΓΩΓΙΚΗΣ ΙΚΑΝΟΤΗΤΑΣ

Αρχή της μεθόδου

Η αναγωγική δύναμη σχετίζεται με την αντιοξειδωτική ιδιότητα και αποτελεί έναν αξιόπιστο δείκτη της. Ενώσεις με αναγωγική δύναμη υποδεικνύουν ότι είναι δότες ηλεκτρονίων και μπορούν να ανάγουν οξειδωμένα ενδιάμεσα της λιπιδικής υπεροξείδωσης, έτσι ώστε να δράσουν ως αρχικές ή δευτερεύουσες αντιοξειδωτικές ενώσεις. Στη μέθοδο αυτή, ουσίες, που μπορεί να έχουν κάποια αναγωγική ικανότητα, αντιδρούν με τον Fe^{3+} και τον ανάγουν σε Fe^{2+} , όπου όταν αντιδρά με τον χλωριούχο σίδηρο δίνει ένα σύμπλοκο το οποίο απορροφά στα 700 nm. Το κίτρινο χρώμα του εξεταζόμενου διαλύματος αλλάζει σε αποχρώσεις του πράσινου και του μπλε ανάλογα με την αναγωγική δύναμη της εξεταζόμενης ουσίας. Όσο μεγαλύτερη είναι η απορρόφηση στα 700nm, τόσο μεγαλύτερη είναι και η αναγωγική δύναμη.

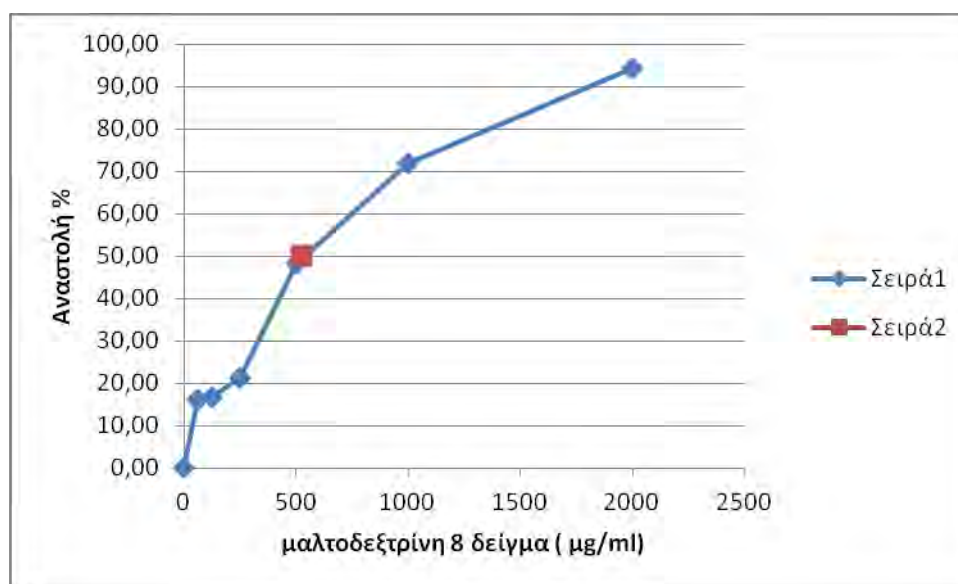
Η αναγωγική δύναμη προσδιορίστηκε σύμφωνα με τη μέθοδο των Yen & Duh (1994).

Τα δείγματά μας διαλύθηκαν σε phosphate buffer (0.2M, pH 6.6). Προστέθηκαν 2.5 ml από το διάλυμα των δειγμάτων μας σε 2.5 ml potassium ferricyanide 1% και τα δείγματα μας επώαστηκαν σε υδατόλουτρο στους 50 °C για 20 λεπτά. Ακολούθησε μεταφορά τους στον πάγο για 5 λεπτά. Στη συνέχεια, προστέθηκαν 2.5 ml TCA 10% και πραγματοποιήθηκε φυγοκέντρηση στα 3000 rpm για 10 λεπτά. Στο υπερκείμενο (2.5 ml) προστέθηκαν 2.5 ml απιονισμένου νερού και 0.5 ml ferric chloride 0.1 % και τα αφήσαμε για 10 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου. Έπειτα ακολούθησε η μέτρηση της απορρόφησης στα 700 nm.

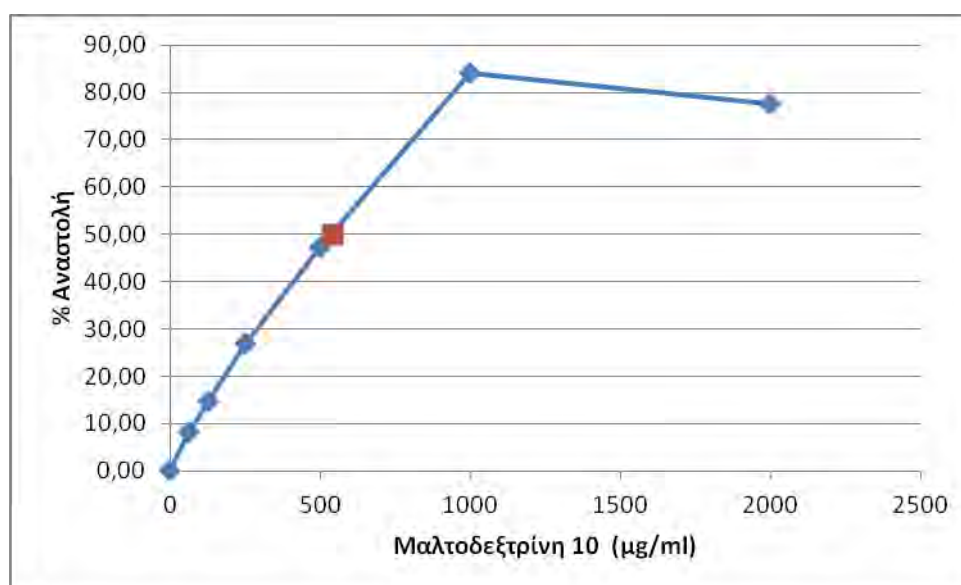
8. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

8.1 ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΜΕΘΟΔΟΥ DPPH

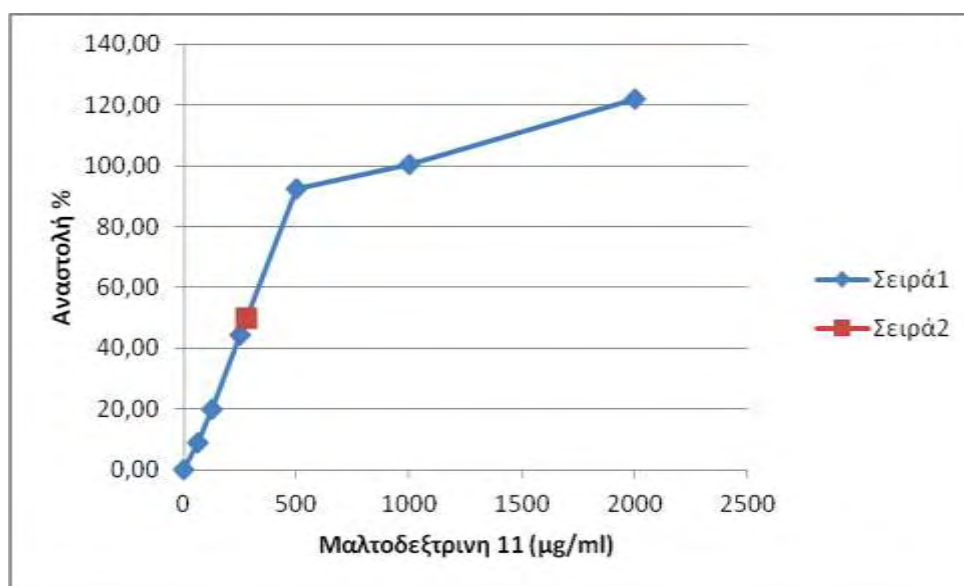
Συνολικά μελετήθηκαν και με τις δυο μεθόδους 23 δείγματα από τα ενθυλακωμένα σε πρωτεΐνη ζελατίνη και μαλτοδεξτρίνη παράγωγα αποβλήτων ελαιοτριβείου. Όλα τα δείγματα μελετήθηκαν στις συγκεντρώσεις 62.5, 125, 250, 500, 1000 και 2000 $\mu\text{g/ml}$. Όλα τα εκχυλίσματα παρουσίασαν από αρκετή ως μεγάλη ικανότητα αλληλεπίδρασης με τη ρίζα DPPH[•]. Το εύρος των τιμών IC₅₀ κυμαινόταν από 288 έως και 750 $\mu\text{g/ml}$. Από τα 23 δείγματα το πιο ισχυρό ήταν το 15^ο δείγμα της μαλτοδεξτρίνης (Γράφημα 4) με IC₅₀ ίσο με 288 $\mu\text{g/ml}$ ενώ το πιο ασθενές ήταν αυτό της ζελατίνης 2 με IC₅₀ ίσο με 750 (Γράφημα 15). Παρακάτω παρουσιάζονται αριθμημένα τα γραφήματα που απεικονίζουν την % αναστολή (εξουδετέρωση) της ρίζας DPPH[•] από τα εξετασθέντα ενθυλακωμένα δείγματα αποβλήτων ελαιοτριβείου.



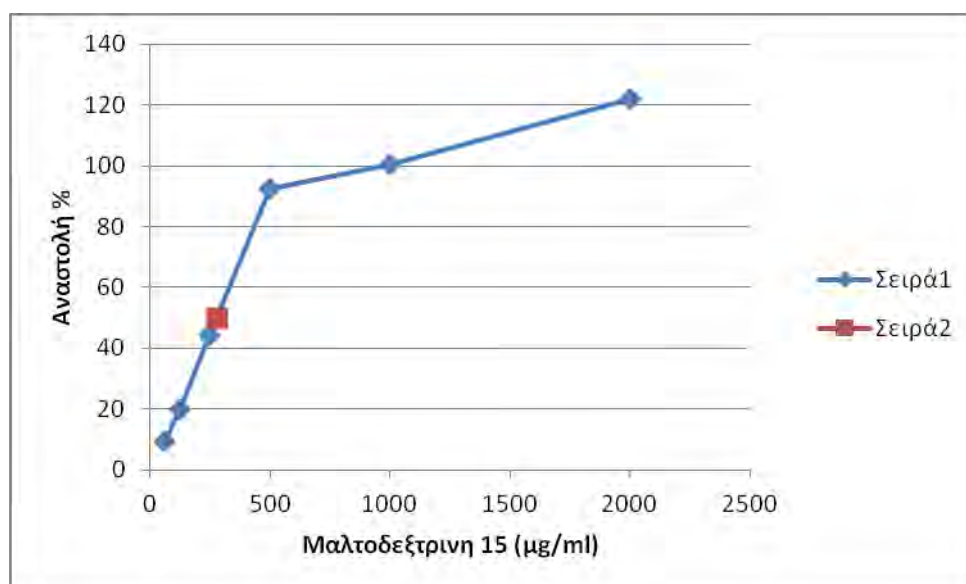
Γράφημα 1 – Η % αναστολή (εξουδετέρωση) της ρίζας DPPH• από το δείγμα 8 της μαλτοδεξτρίνης



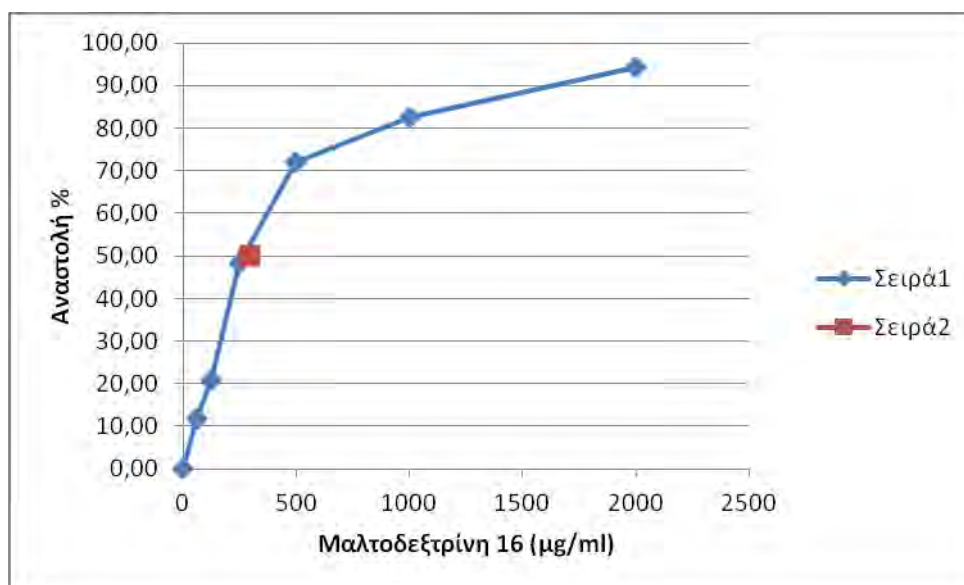
Γράφημα 2 - Η % αναστολή (εξουδετέρωση) της ρίζας DPPH• από το δείγμα 10 της μαλτοδεξτρίνης



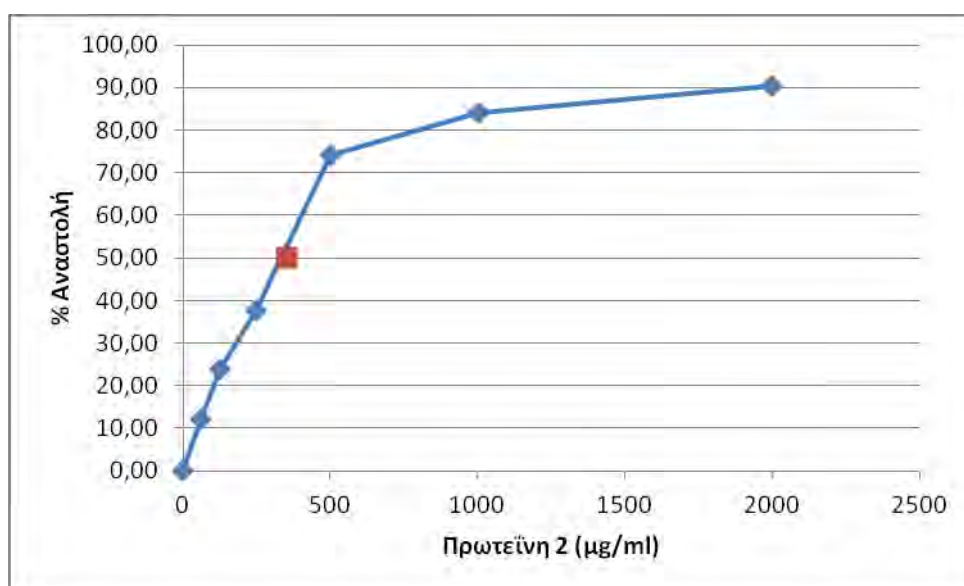
Γράφημα 3 - Η % αναστολή (εξουδετέρωση) της ρίζας DPPH• από το δείγμα 11 της μαλτοδεξτρίνης



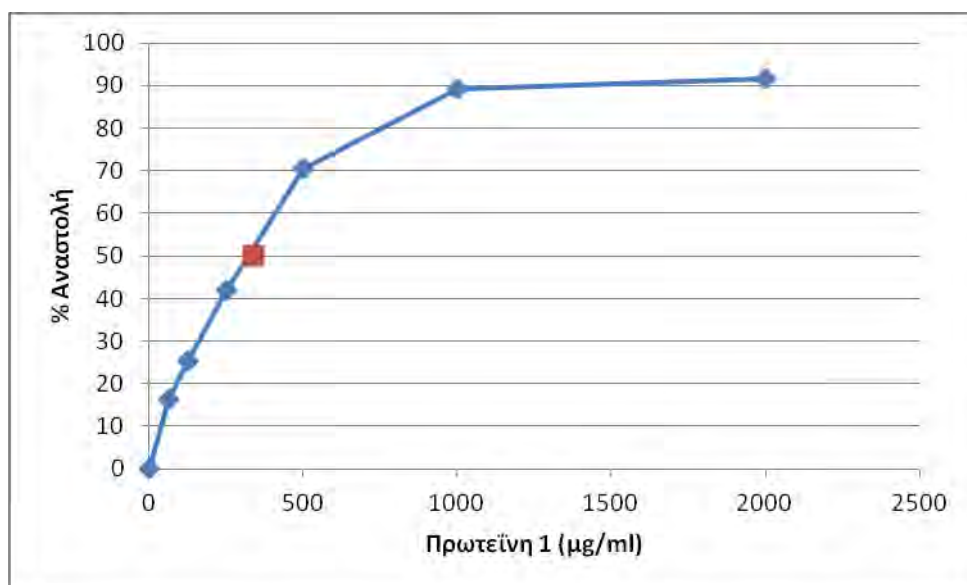
Γράφημα 4 - Η % αναστολή (εξουδετέρωση) της ρίζας DPPH• από το δείγμα 15 της μαλτοδεξτρίνης



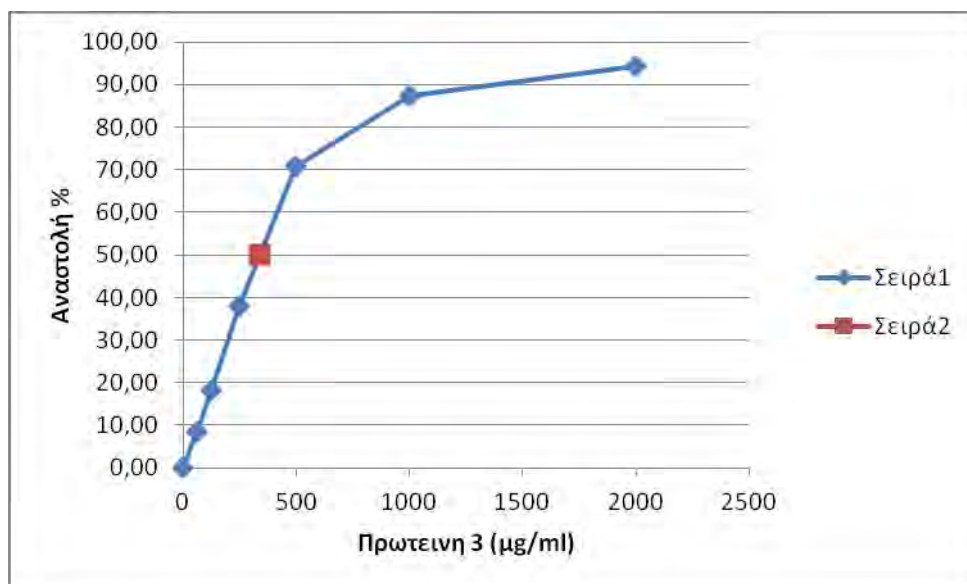
Γράφημα 5 - Η % αναστολή (εξουδετέρωση) της ρίζας DPPH[•] από το δείγμα 16 της μαλτοδεξτρίνης



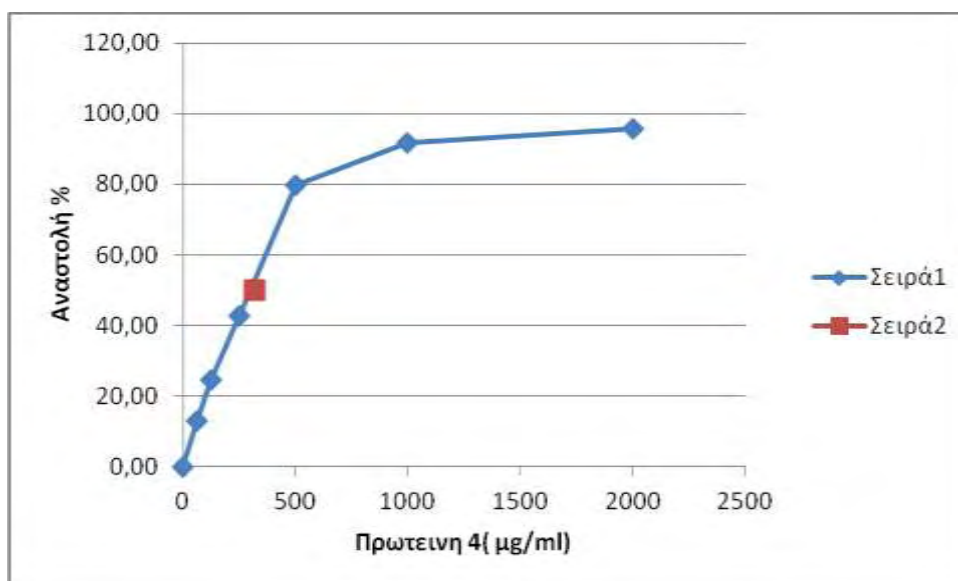
Γράφημα 6 - Η % αναστολή (εξουδετέρωση) της ρίζας DPPH[•] από το δείγμα 2 των πρωτεϊνών



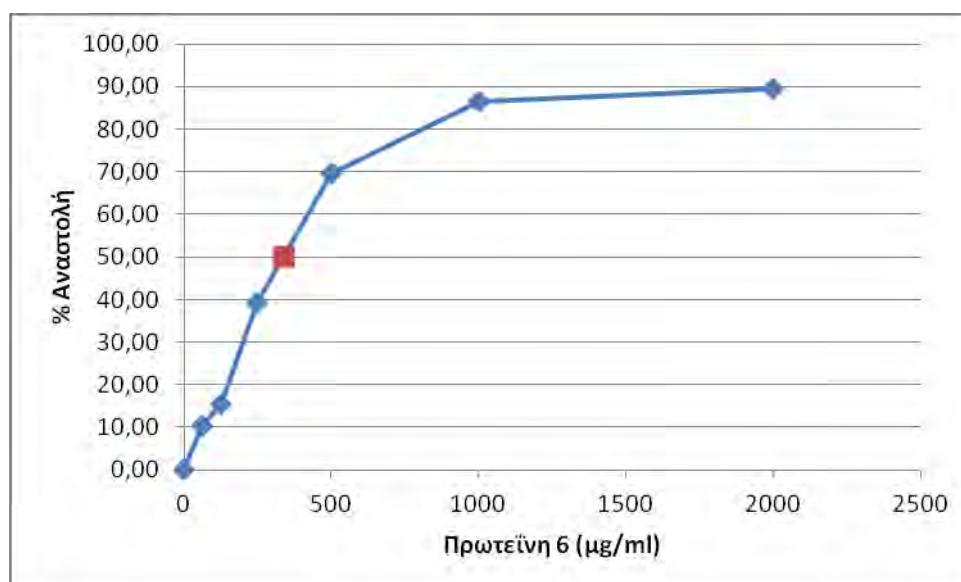
Γράφημα 7 - Η % αναστολή (εξουδετέρωση) της ρίζας DPPH[•] από το δείγμα 1 των πρωτεϊνών



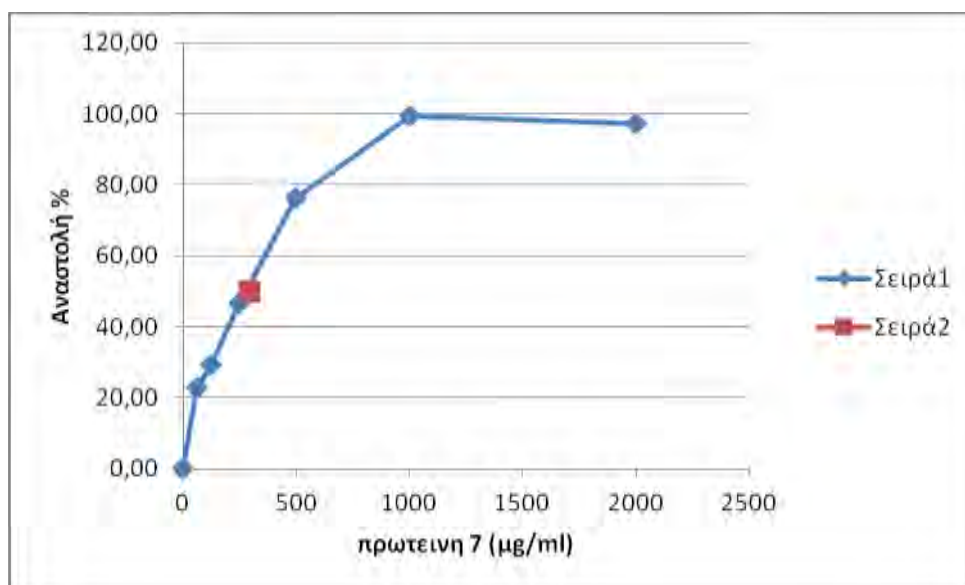
Γράφημα 8 - Η % αναστολή (εξουδετέρωση) της ρίζας DPPH[•] από το δείγμα 3 των πρωτεϊνών



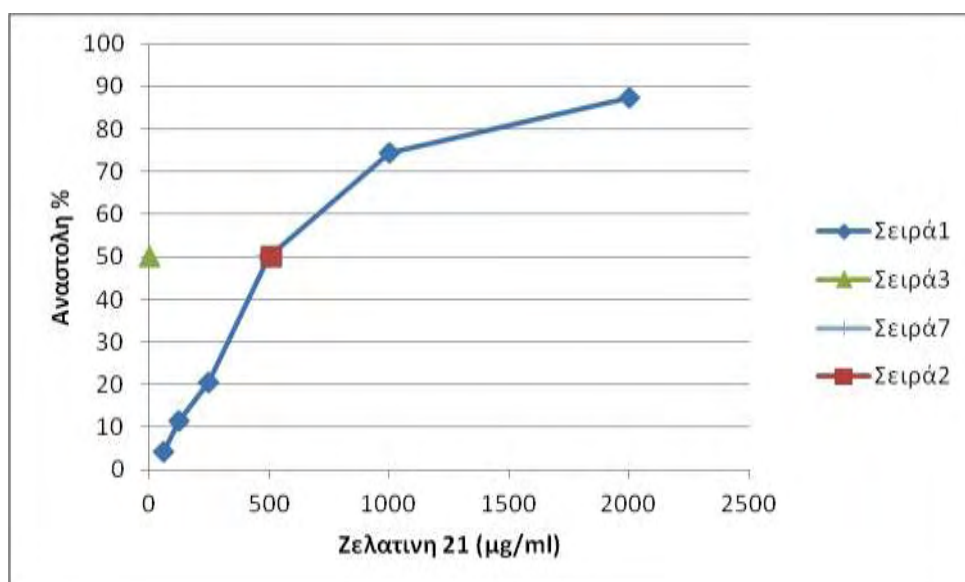
Γράφημα 9 - Η % αναστολή (εξουδετέρωση) της ρίζας DPPH[•] από το δείγμα 4 των πρωτεϊνών



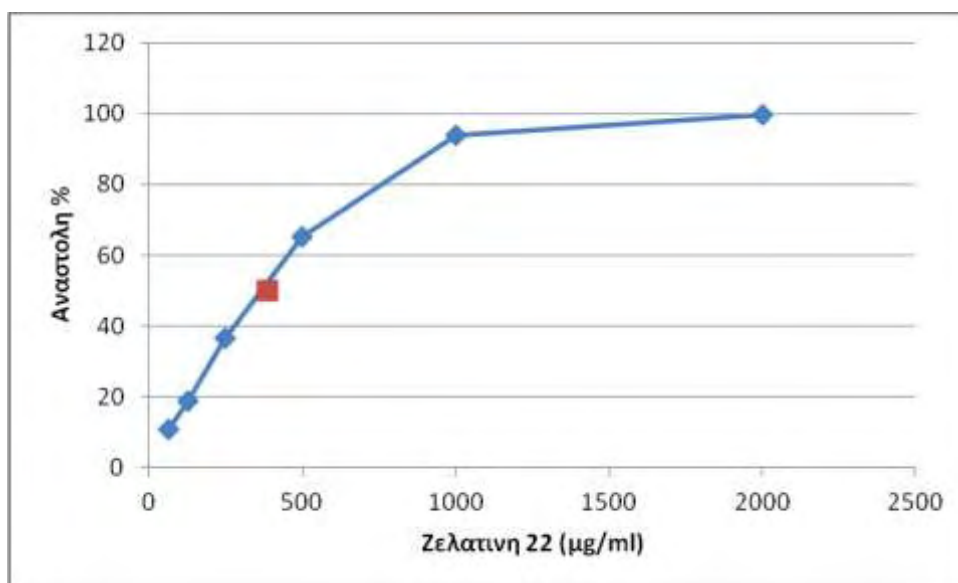
Γράφημα 10 - Η % αναστολή (εξουδετέρωση) της ρίζας DPPH[•] από το δείγμα 6 των πρωτεϊνών



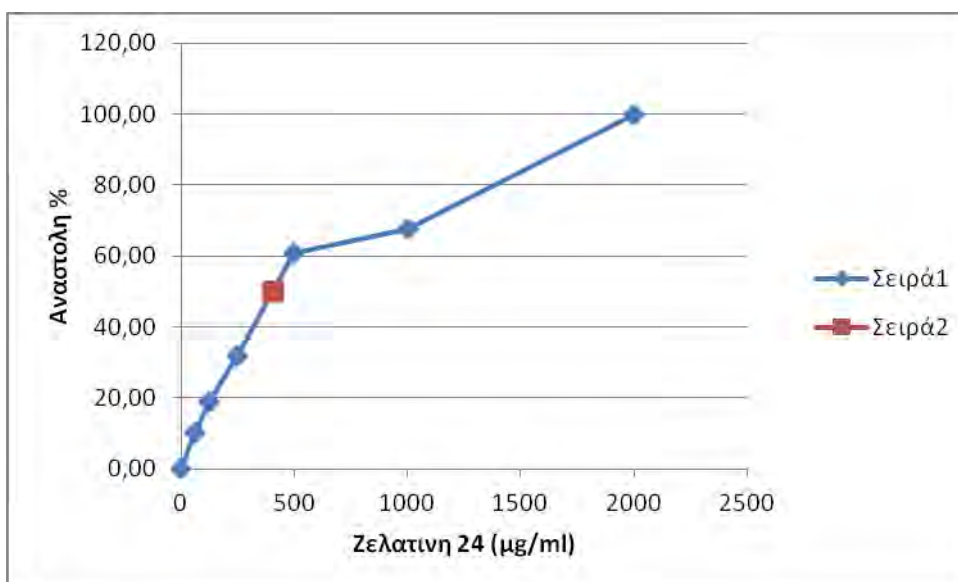
Γράφημα 11 - Η % αναστολή (εξουδετέρωση) της ρίζας DPPH[•] από το δείγμα 7 των πρωτεϊνών



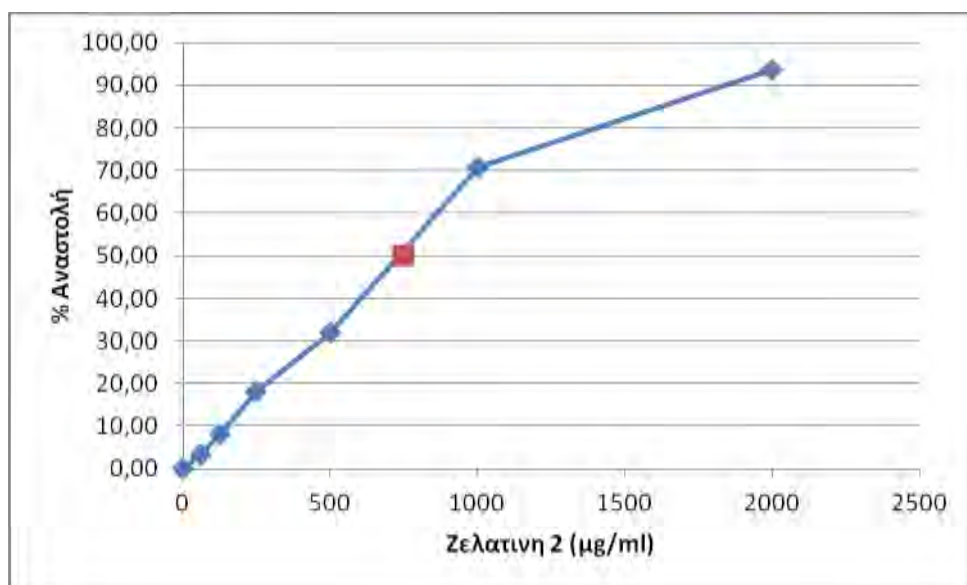
Γράφημα 12 - Η % αναστολή (εξουδετέρωση) της ρίζας DPPH[•] από το δείγμα 21 των ζελατινών



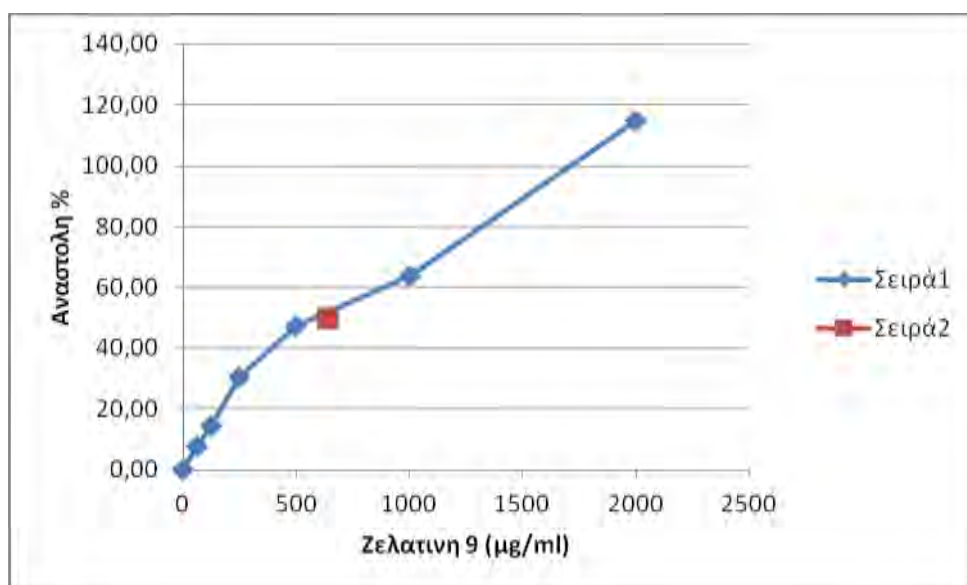
Γράφημα 13 - Η % αναστολή (εξουδετέρωση) της ρίζας DPPH[•] από το δείγμα 22 των ζελατινών



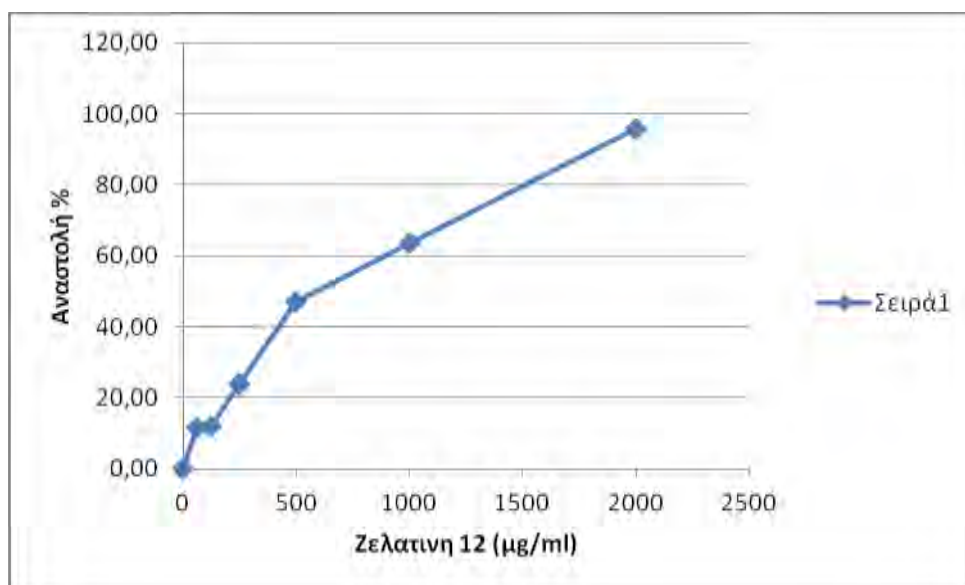
Γράφημα 14 - Η % αναστολή (εξουδετέρωση) της ρίζας DPPH[•] από το δείγμα 24 των ζελατινών



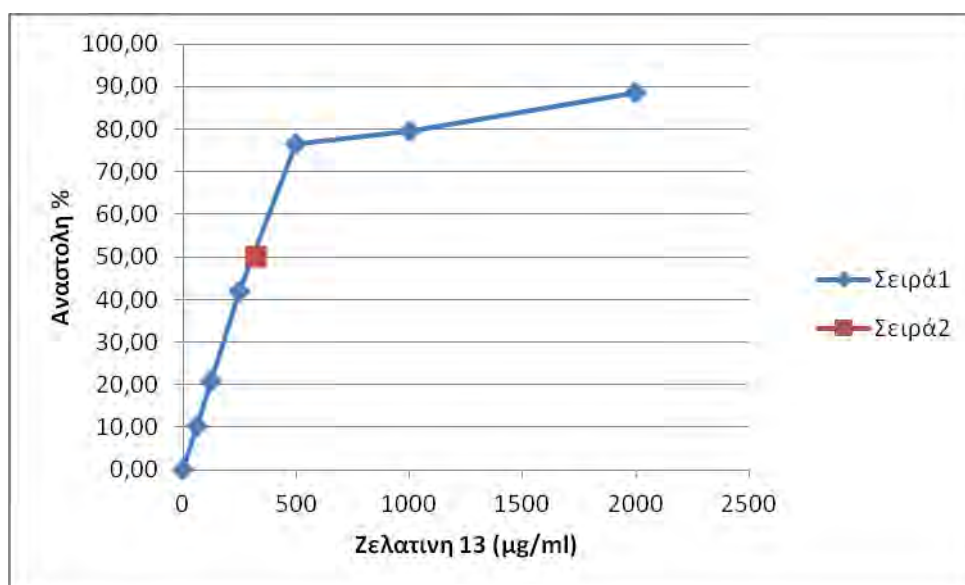
Γράφημα 15 - Η % αναστολή (εξουδετέρωση) της ρίζας DPPH[•] από το δείγμα 2 των ζελατινών



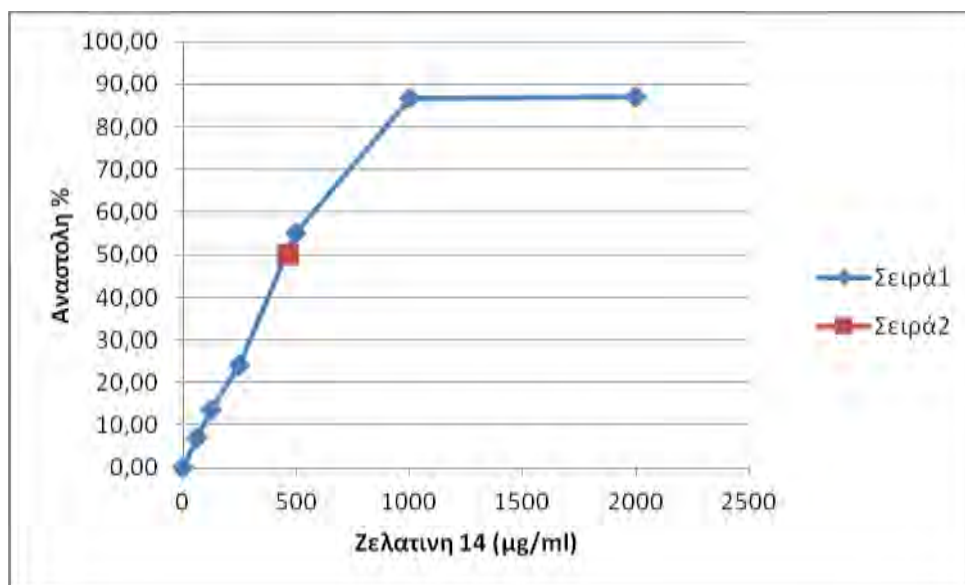
Γράφημα 16 - Η % αναστολή (εξουδετέρωση) της ρίζας DPPH[•] από το δείγμα 9 των ζελατινών



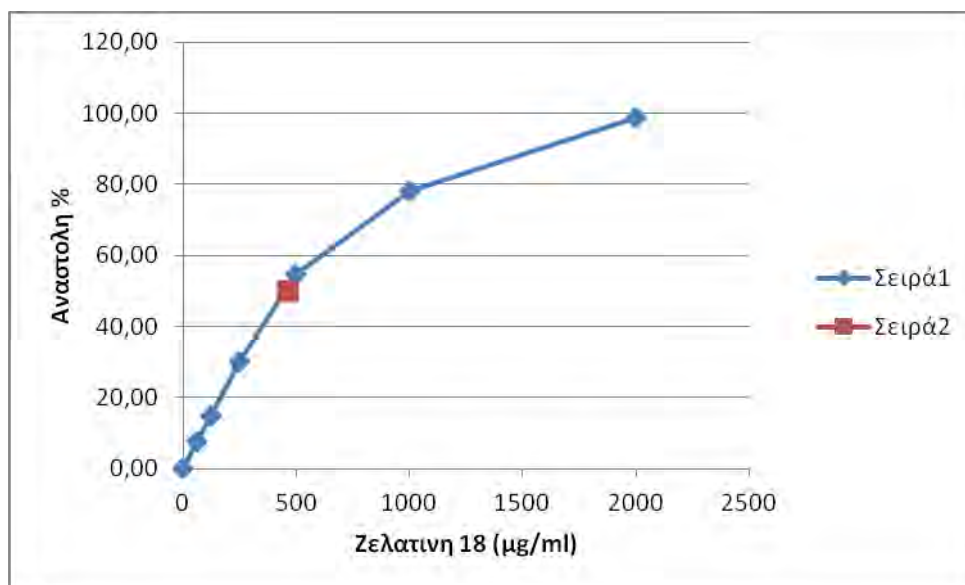
Γράφημα 17 - Η % αναστολή (εξουδετέρωση) της ρίζας DPPH[•] από το δείγμα 12 των ζελατινών



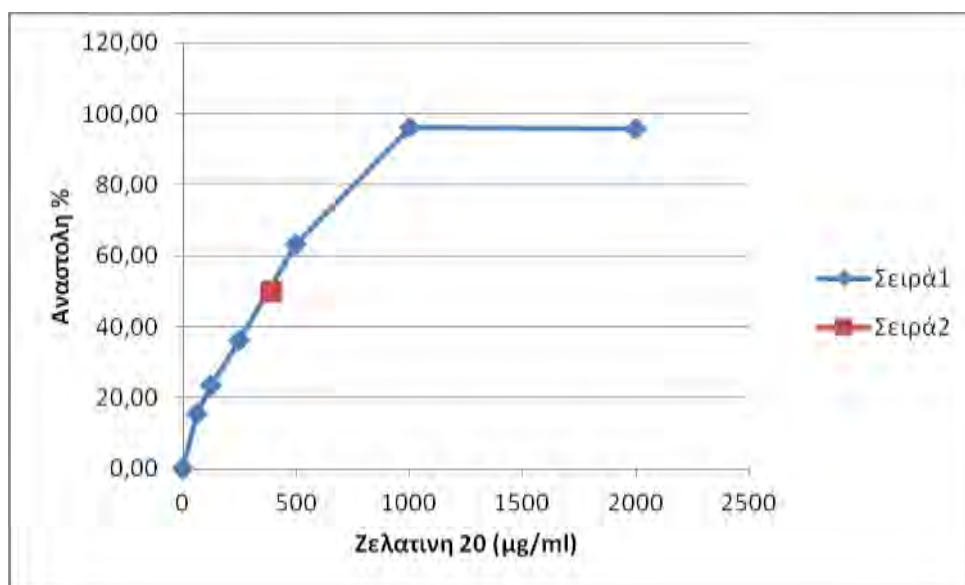
Γράφημα 18 - Η % αναστολή (εξουδετέρωση) της ρίζας DPPH[•] από το δείγμα 13 των ζελατινών



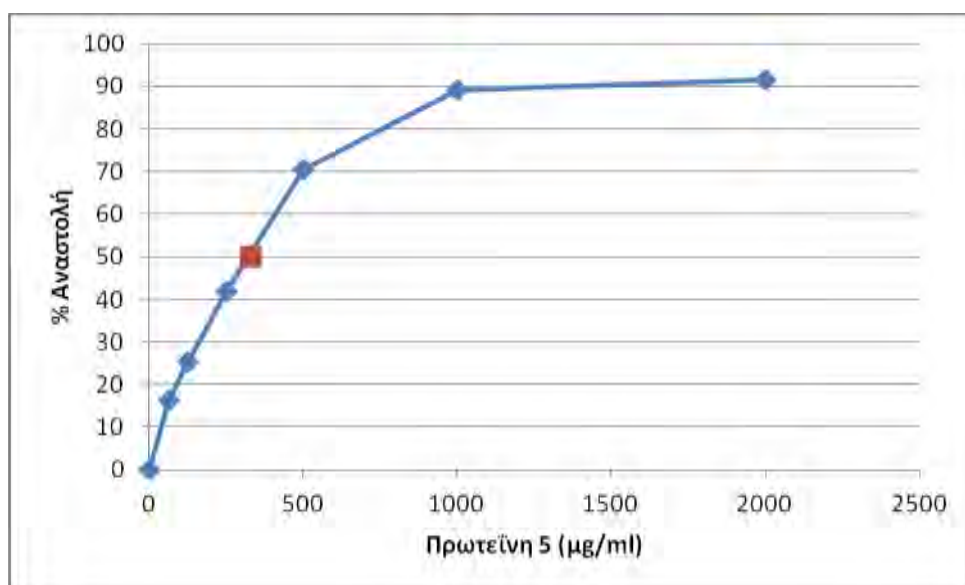
Γράφημα 19 - Η % αναστολή (εξουδετέρωση) της ρίζας DPPH[•] από το δείγμα 14 των ζελατινών



Γράφημα 20 - Η % αναστολή (εξουδετέρωση) της ρίζας DPPH[•] από το δείγμα 18 των ζελατινών

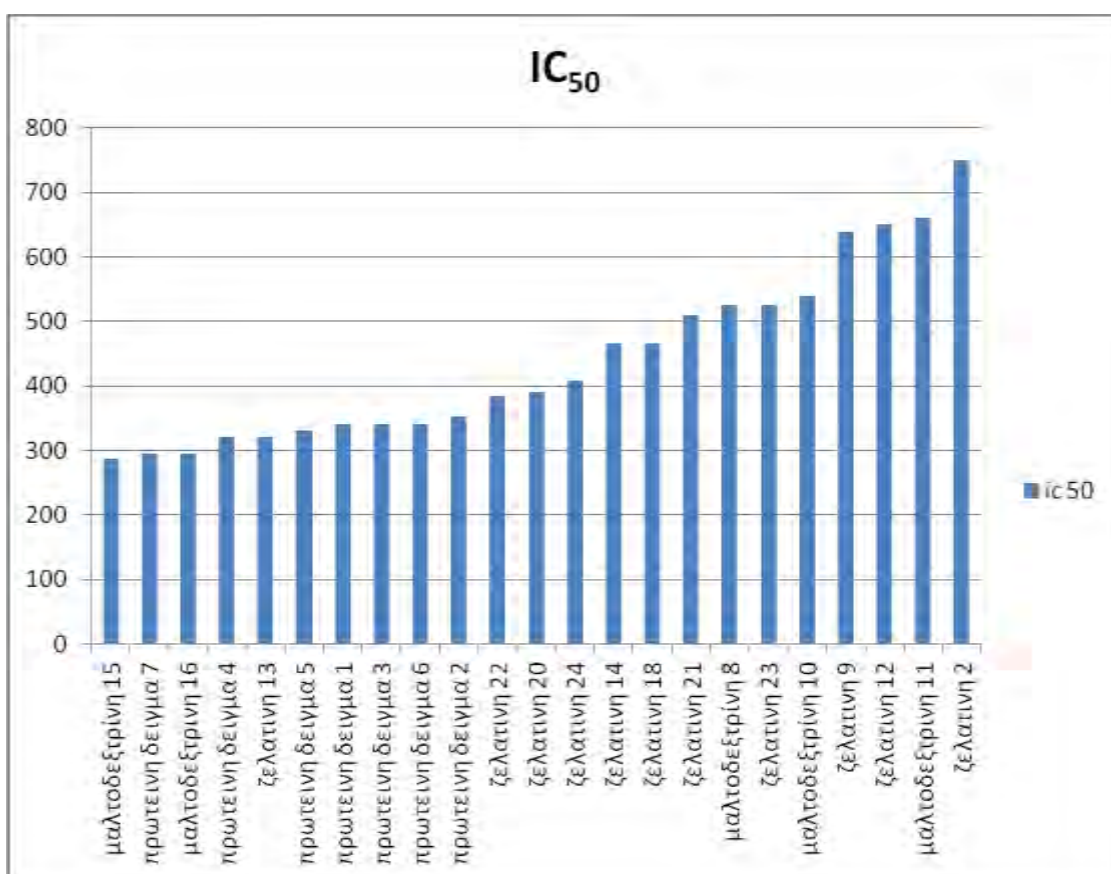


Γράφημα 21 - Η % αναστολή (εξουδετέρωση) της ρίζας DPPH• από το δείγμα 20 των ζελατινών



Γράφημα 22 - Η % αναστολή (εξουδετέρωση) της ρίζας DPPH• από το δείγμα 5 των πρωτεϊνών

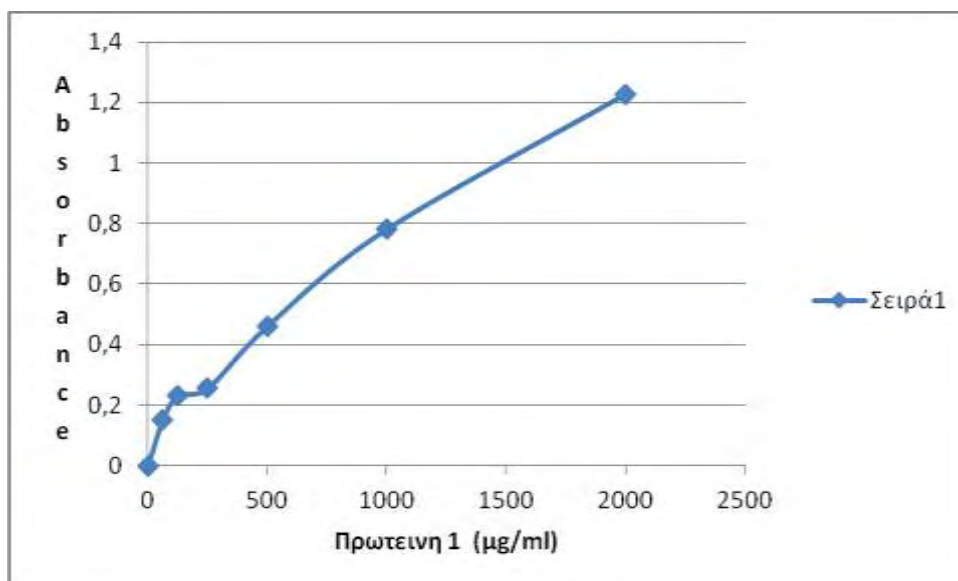
Στον παρακάτω συγκεντρωτικό πίνακα απεικονίζεται τιμή IC_{50} όλων των δειγμάτων σε σχέση με την αλληλεπίδρασή τους με την ρίζα $DPPH^{\bullet}$. Από τον παρακάτω πίνακα φαίνεται η αντιοξειδωτική ικανότητα όλων των δειγμάτων. Όσο μικρότερο είναι το IC_{50} τόσο μεγαλύτερη είναι η αντιοξειδωτική ικανότητα των δειγμάτων.



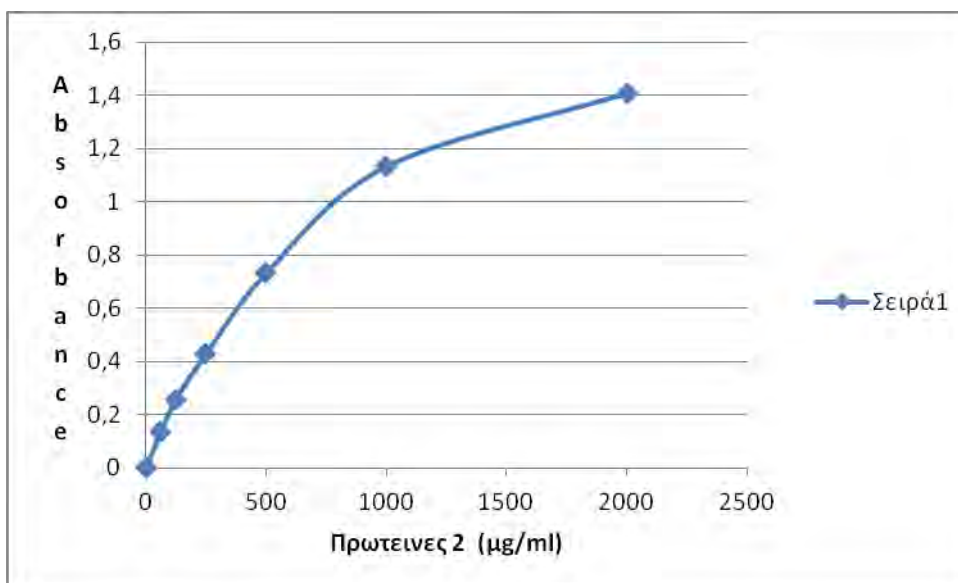
Πίνακας 5 - Συγκεντρωτικός πίνακας IC_{50} των δειγμάτων

8.2 ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΜΕΘΟΔΟΥ ΑΝΑΓΩΓΙΚΗΣ ΔΥΝΑΜΗΣ

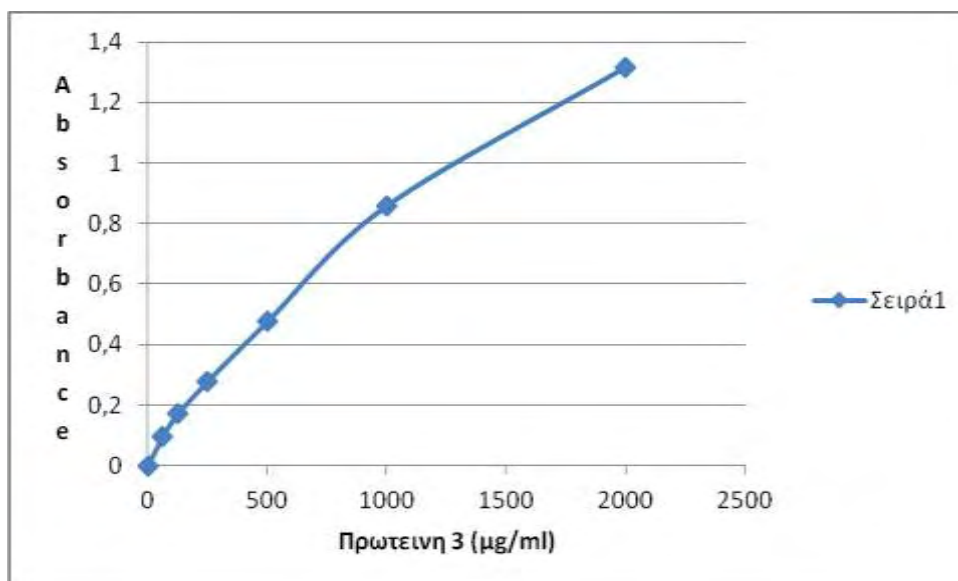
Συνολικά μελετήθηκαν και με τις δυο μεθόδους 23 δείγματα από τα ενθυλακωμένα σε πρωτεΐνη ζελατίνη και μαλτοδεξτρίνη παράγωγα αποβλήτων ελαιοτριβείου. Όλα τα δείγματα μελετήθηκαν στις συγκεντρώσεις 62.5, 125, 250, 500, 1000 και 2000 $\mu\text{g/ml}$. Τα αποτελέσματα με την αναγωγική μέθοδο παρουσίασαν κάποιες ιδιομορφίες όσον αφορά το τελικό τους αποτέλεσμα. Το εύρος των τιμών $R.P_{0,5AU}$ κυμαινόταν από 434,28 έως και 750 $\mu\text{g/ml}$. Από τα 23 δείγματα το πιο ισχυρό ήταν το 2ο δείγμα της πρωτεΐνης (Γράφημα 24) με $R.P_{0,5AU}$ ίσο με 434,28 $\mu\text{g/ml}$ ενώ το πιο ασθενές ήταν αυτό της μαλτοδεξτρίνης 10 με $R.P_{0,5AU}$ ίσο με 860 (Γράφημα 31). Όσον αφορά τα δείγματα της ζελατίνης από ότι φαίνεται δεν παρουσιάζουν κάποια δράση. Παρακάτω παρουσιάζονται αριθμημένα τα γραφήματα που απεικονίζουν την % απορρόφηση από τα εξετασθέντα ενθυλακωμένα δείγματα αποβλήτων ελαιοτριβείου.



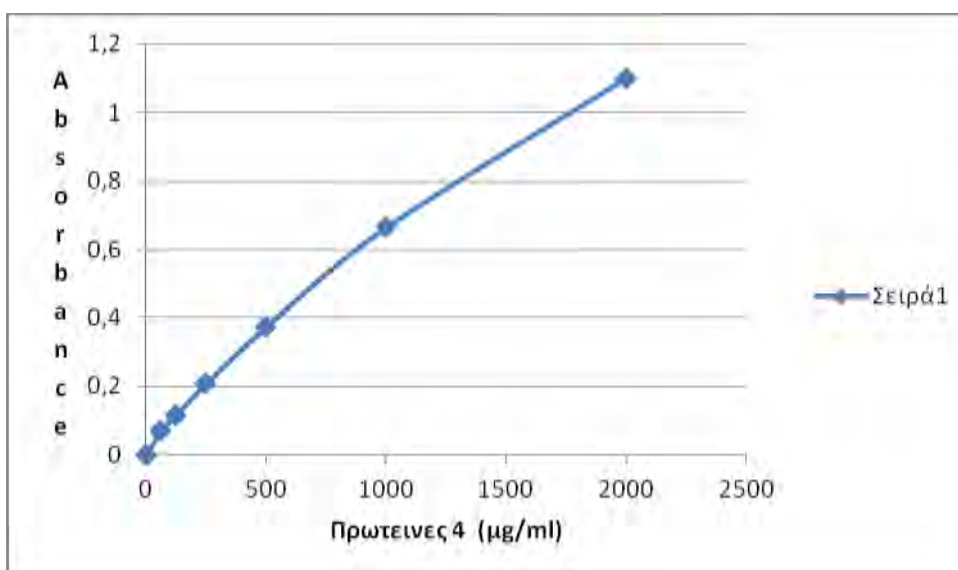
Γράφημα 23 Αναγωγική δύναμη της πρωτεΐνης 1



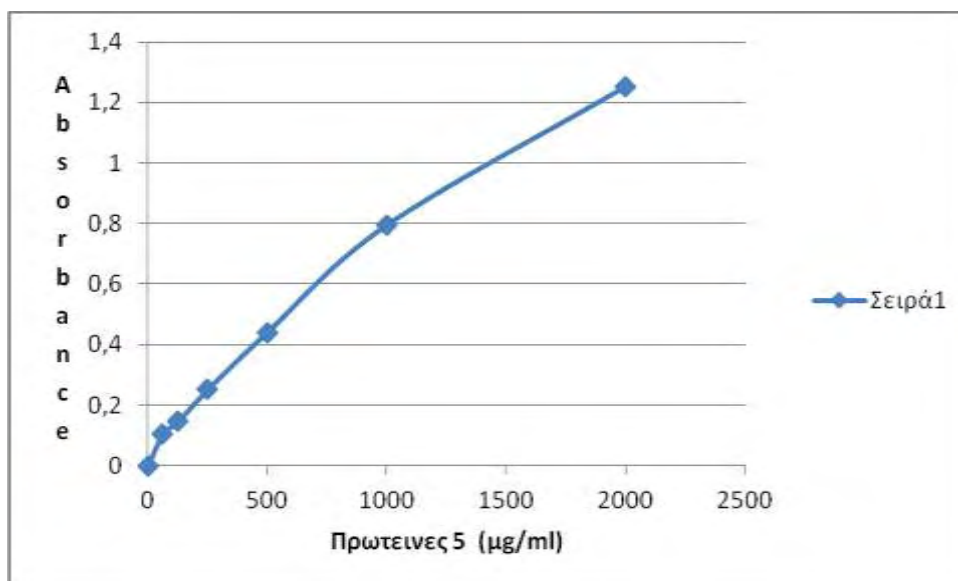
Γράφημα 24 Αναγωγική δύναμη της πρωτεΐνης 2



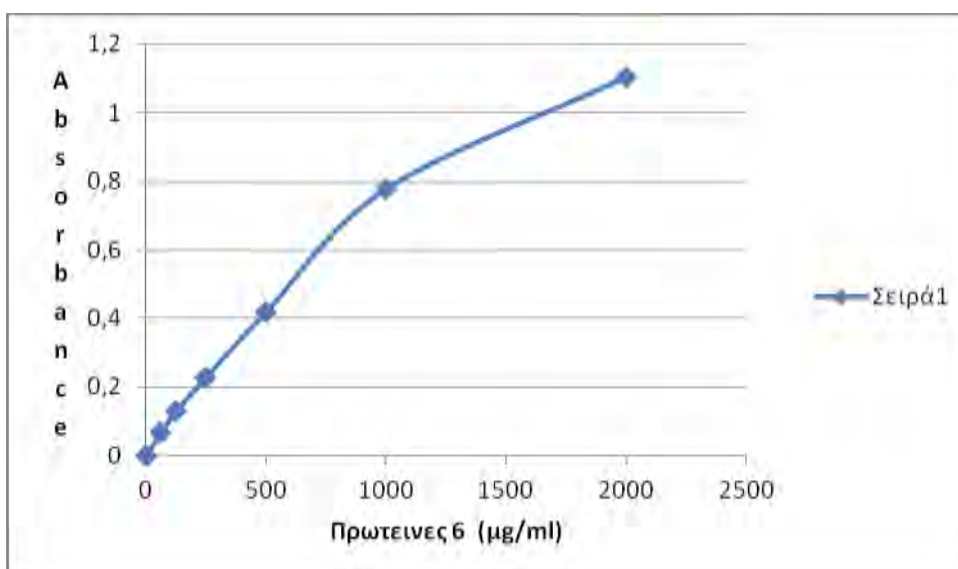
Γράφημα 25 Αναγωγική δύναμη της πρωτεΐνης 3



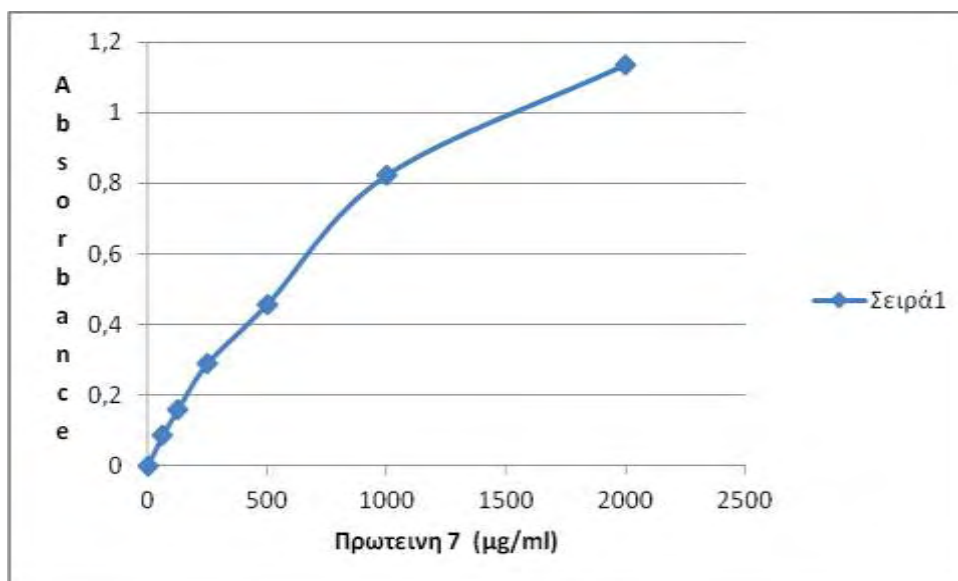
Γράφημα 26 Αναγωγική δύναμη της πρωτεΐνης 4



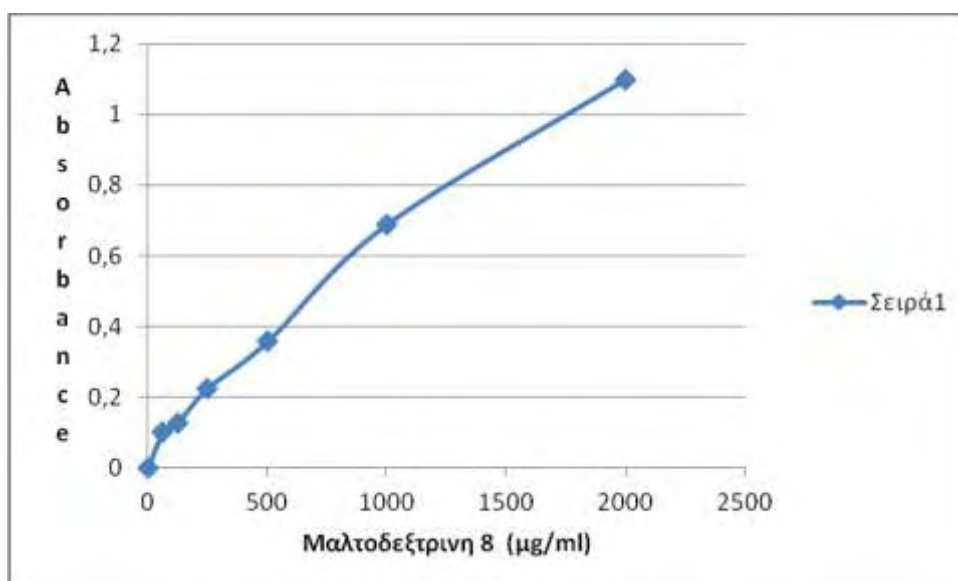
Γράφημα 27 Αναγωγική δύναμη της πρωτεΐνης 5



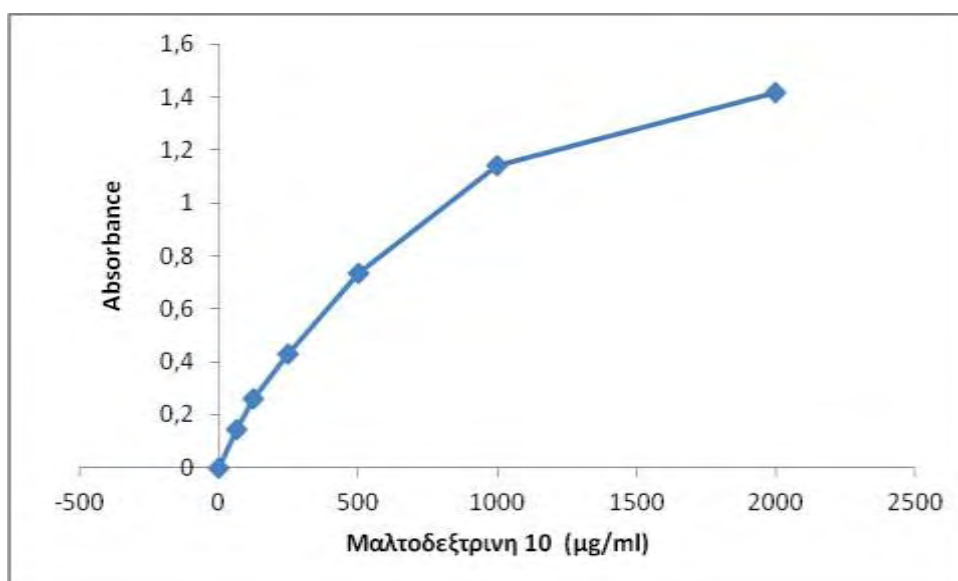
Γράφημα 28 Αναγωγική δύναμη της πρωτεΐνης 6



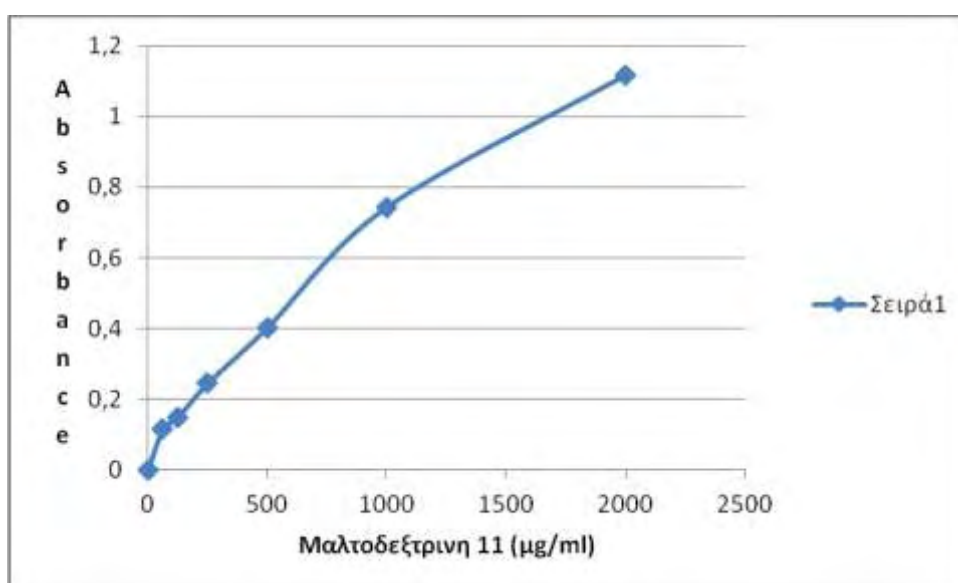
Γράφημα 29 Αναγωγική δύναμη της πρωτεΐνης 7



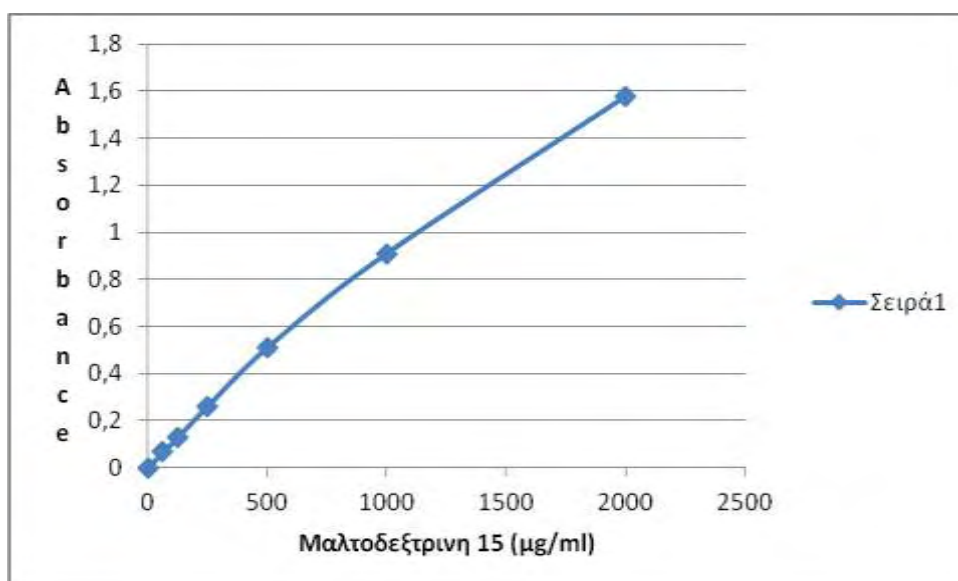
Γράφημα 30 Αναγωγική δύναμη της μαλτοδεξτρίνης 8



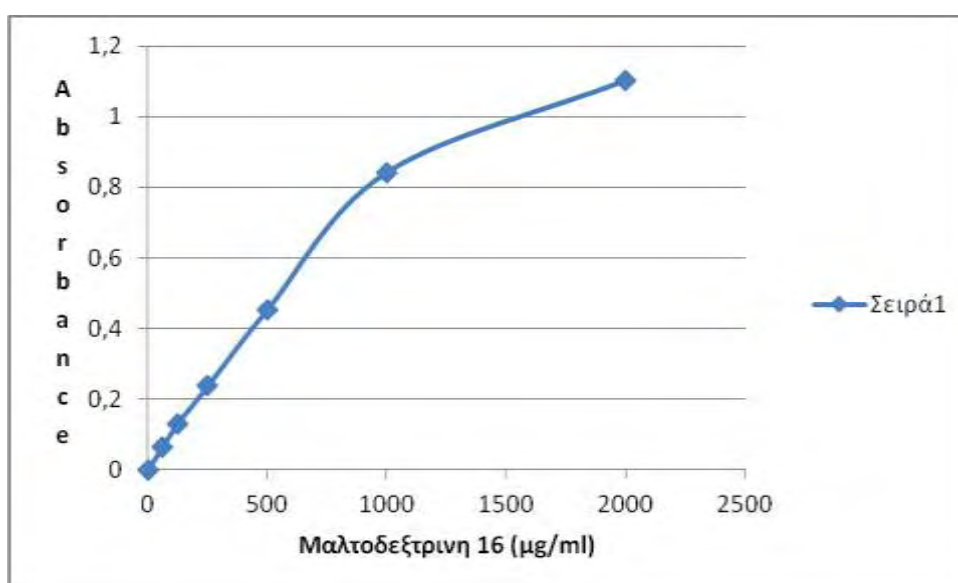
Γράφημα 31 Αναγωγική δύναμη της μαλτοδεξτρίνης 10



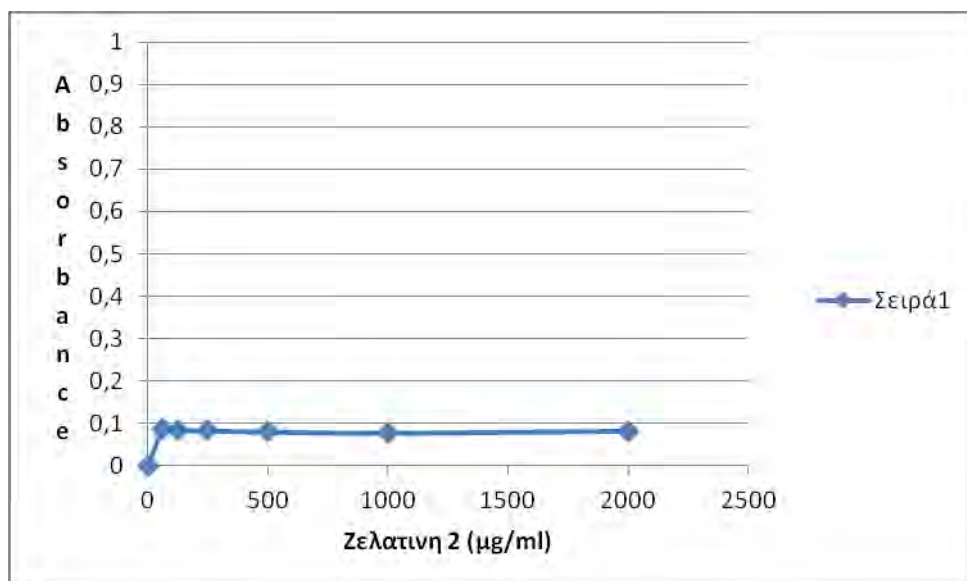
Γράφημα 32 Αναγωγική δύναμη της μαλτοδεξτρίνης 11



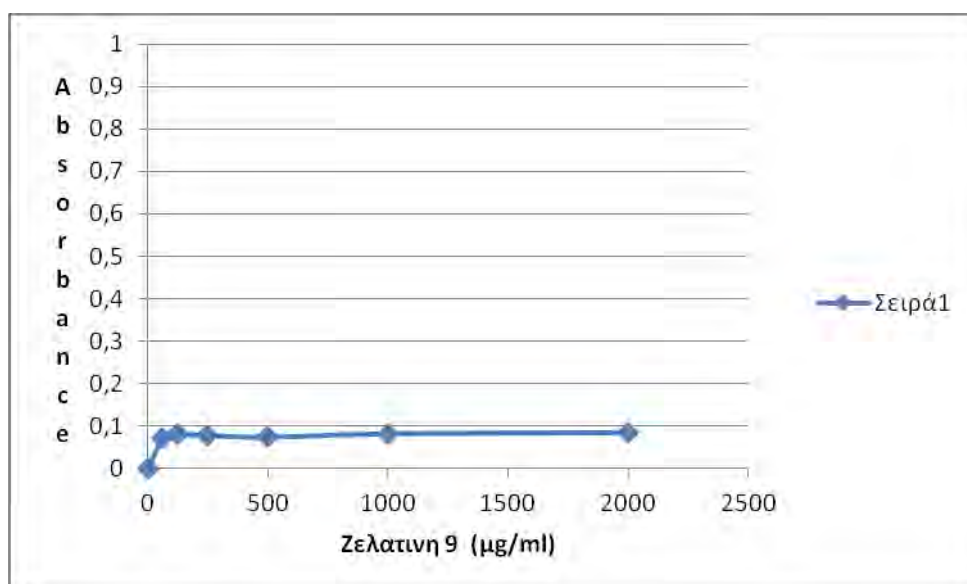
Γράφημα 33 Αναγωγική δύναμη της μαλτοδεξτρίνης 15



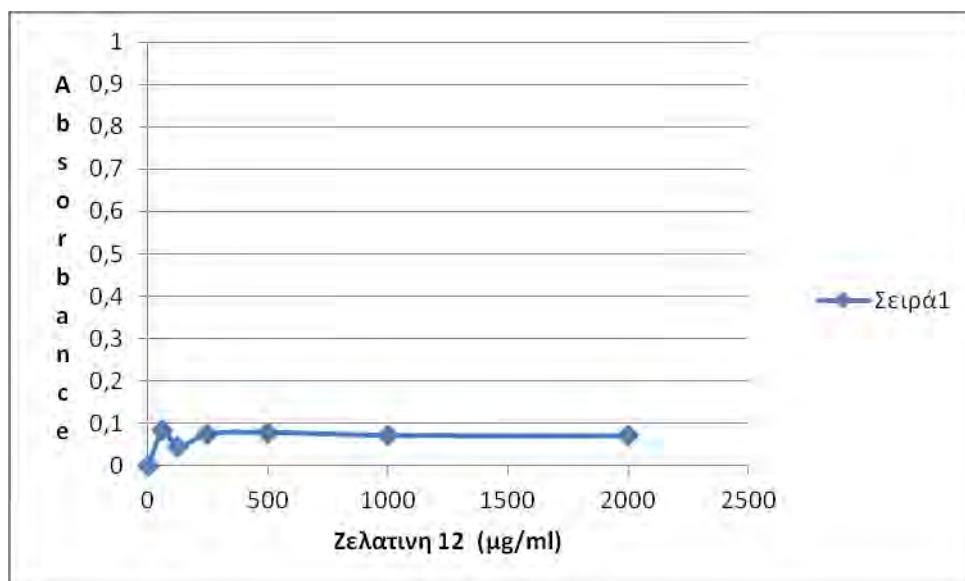
Γράφημα 34 Αναγωγική δύναμη της μαλτοδεξτρίνης 16



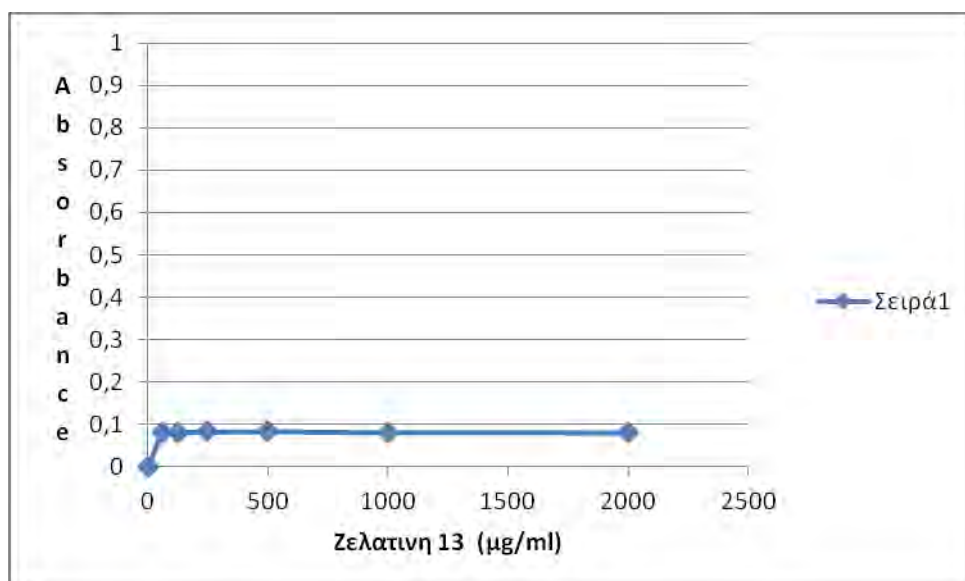
Γράφημα 35 Αναγωγική δύναμη της ζελατίνης 2



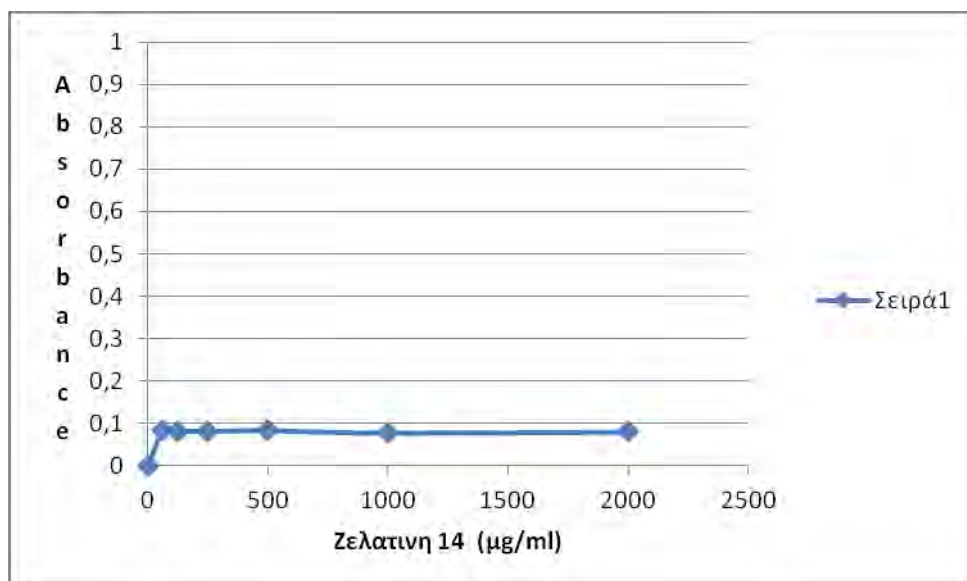
Γράφημα 36 Αναγωγική δύναμη της ζελατίνης 9



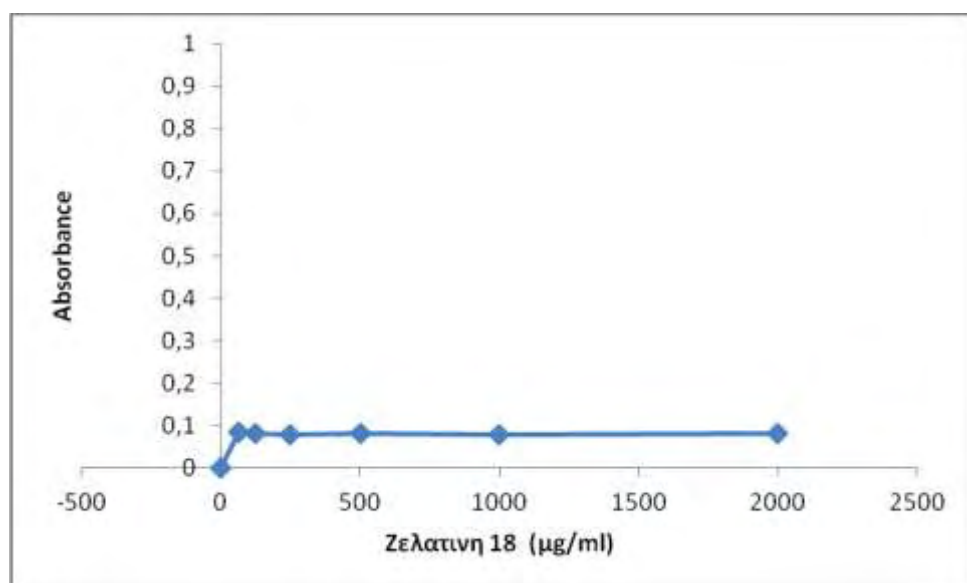
Γράφημα 37 Αναγωγική δύναμη της ζελατίνης 12



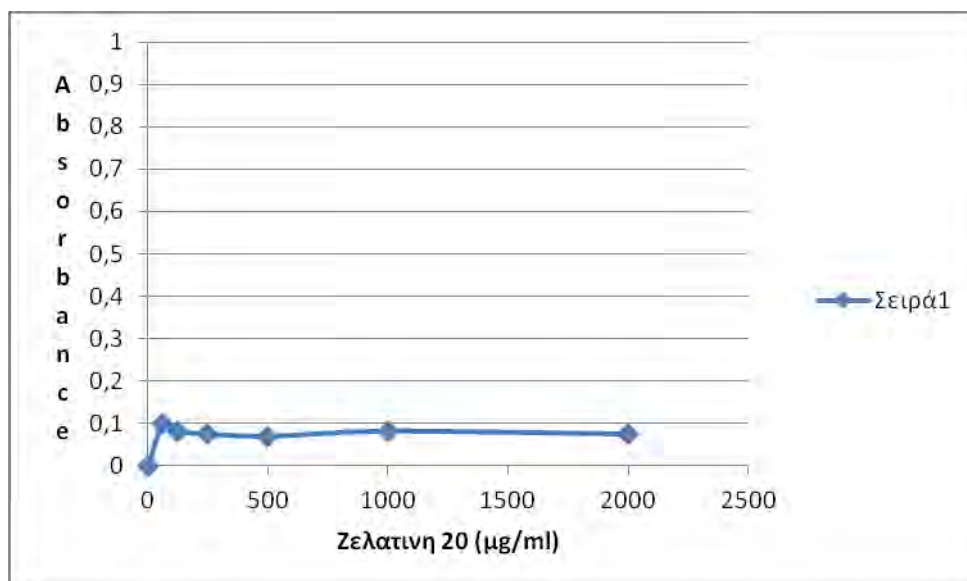
Γράφημα 38 Αναγωγική δύναμη της ζελατίνης 13



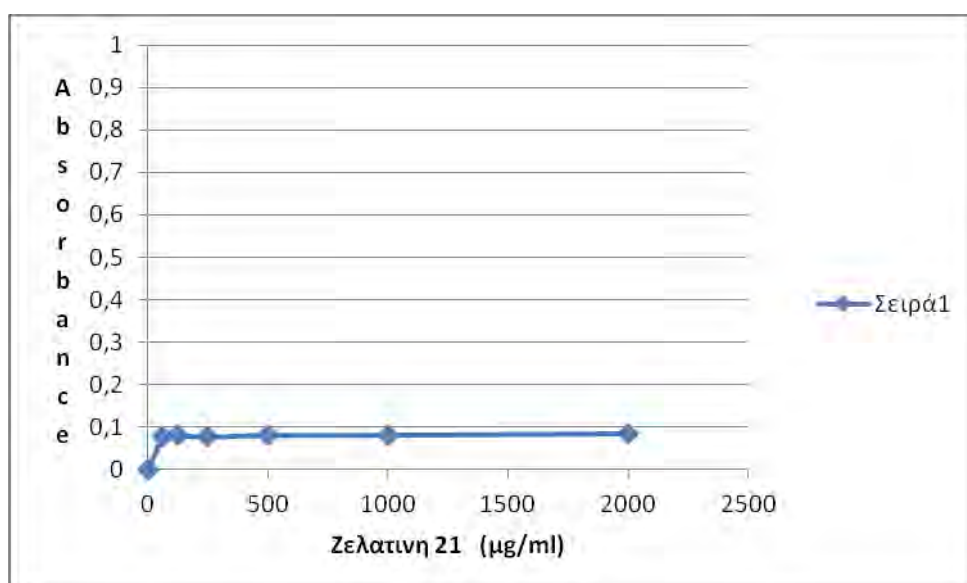
Γράφημα 39 Αναγωγική δύναμη της ζελατίνης 14



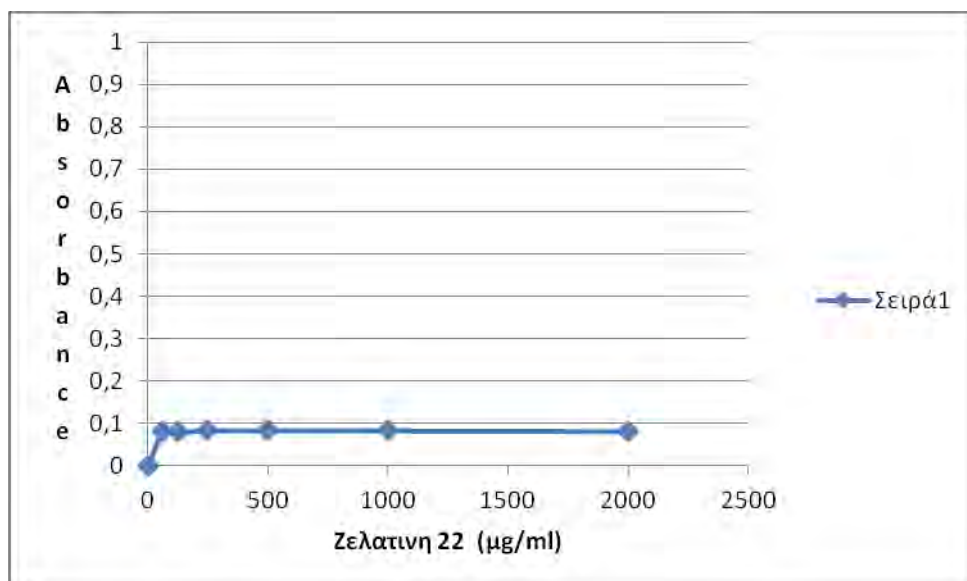
Γράφημα 40 Αναγωγική δύναμη της ζελατίνης 17



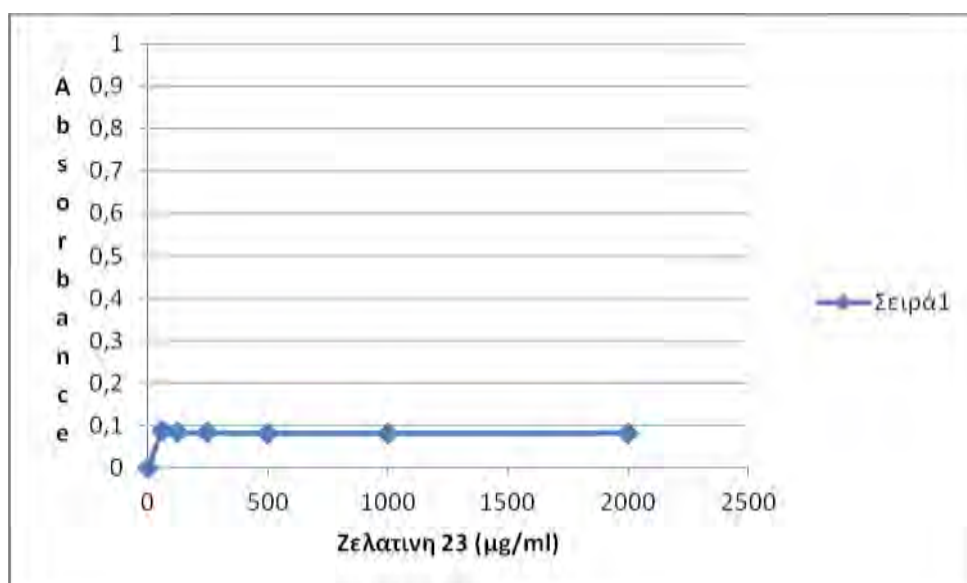
Γράφημα 41 Αναγωγική δύναμη της ζελατίνης 20



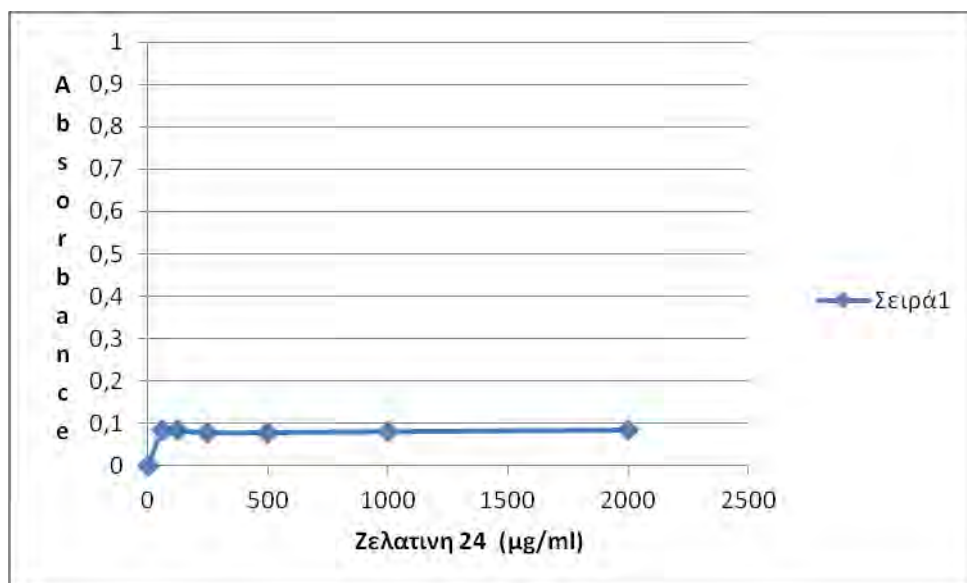
Γράφημα 42 Αναγωγική δύναμη της ζελατίνης 21



Γράφημα 43 Αναγωγική δύναμη της ζελατίνης 22

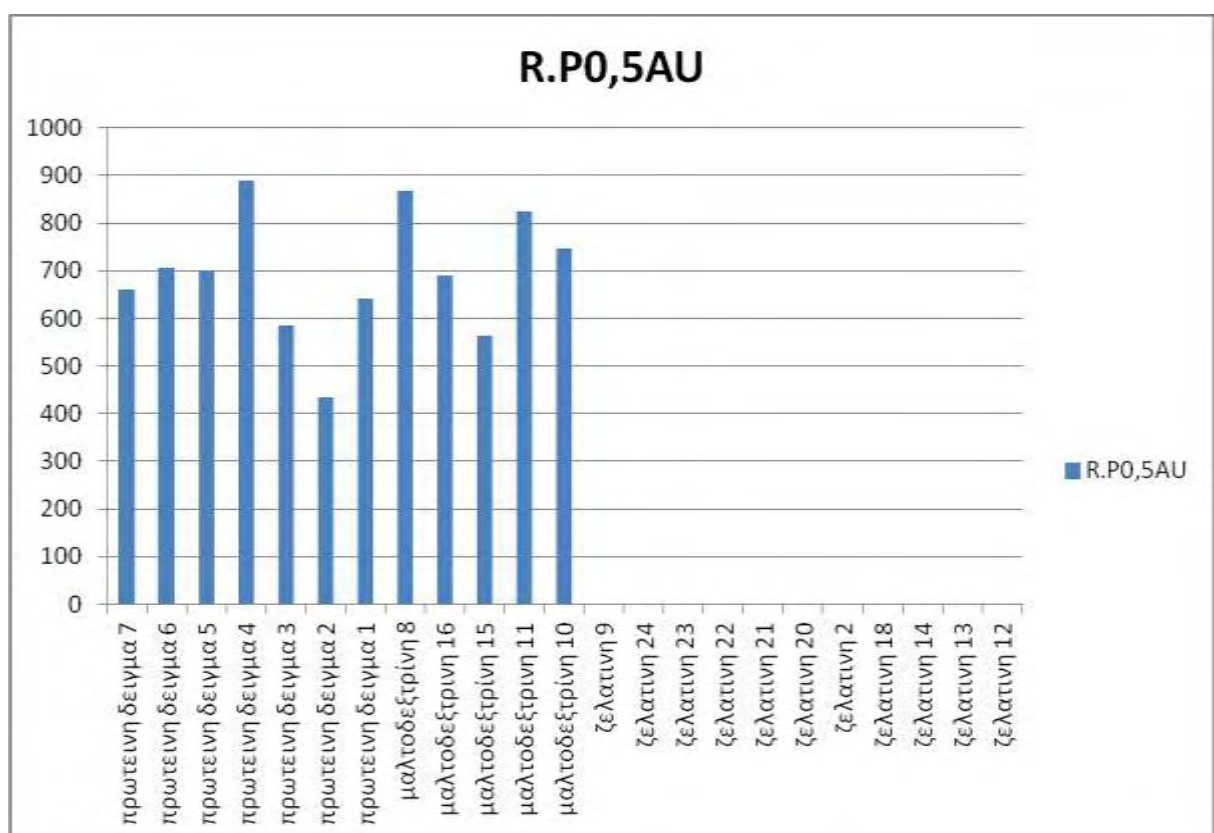


Γράφημα 44 Αναγωγική δύναμη της ζελατίνης 23



Γράφημα 45 Αναγωγική δύναμη της ζελατίνης 24

Στον παρακάτω συγκεντρωτικό πίνακα απεικονίζεται τιμή $R.P_{0,5AU}$ όλων των δειγμάτων καθώς και η αναγωγική τους ικανότητα . Από τον παρακάτω πίνακα φαίνεται η αναγωγική ικανότητα όλων των δειγμάτων. Όσο μικρότερο είναι το $R.P_{0,5AU}$ τόσο μεγαλύτερη είναι η αναγωγική ικανότητα των δειγμάτων.



Πίνακας 6 - Συγκεντρωτικός πίνακας $R.P_{0,5AU}$ των δειγμάτων

9 ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Στις μέρες μας παρουσιάζεται μια συνεχώς αυξανόμενη τάση προς την παραγωγή και κατανάλωση προϊόντων φυτικής προέλευσης. Αυτό οφείλεται στην μεγάλη βιοδραστικότητα που έχουν τέτοιες τροφές πράγμα που έχει αποδειχτεί μέσα από μεγάλο αριθμό ερευνών που έχουν πραγματοποιηθεί. Όσον αφορά την παράγωγή της ελιάς και των προϊόντων της μπορούμε να πούμε ότι έχει παρατηρηθεί μια εξίσου μεγάλη ζήτηση για ανάλυση των προϊόντων της καθώς και των ευεργετικών ιδιοτήτων τους για την ανθρωπινή υγεία. Αυτό φαίνεται και από το μεγάλο αριθμό (700) ερευνών γύρω από την ελιά και τα προϊόντα της. Όπως έχει προαναφερθεί τα ΔΕΟ εμπλέκονται σε μείζονος σημασίας δραστηριότητες του οργανισμού όπως φαγοκυττάρωση, ρύθμιση κυτταρικού πολλαπλασιασμού, ενδοκυτταρική σηματοδότηση και σύνθεση βιολογικά δραστικών ενώσεων (Miquel and Romano-Bosca, 2004) καθώς επίσης και έχουν εμπλακεί σε διάφορες ασθένειες όπως καρκινογένεση, καρδιακές παθήσεις, αρτηριοσκλήρωση, διαβήτη και πολλές ασθένειες που έχουν να κάνουν με τη γήρανση (Honda et al., 2004; Uchida, 2000). Παρόλα αυτά όλοι οι οργανισμοί συμπεριλαμβανομένου και του ανθρώπου έχουν αντιοξειδωτικούς μηχανισμούς που προστατεύουν από οξειδωτική βλάβη και επιδιορθώνουν τα κατεστραμμένα μόρια (Espin et al., 2000; Greenwald et al., 2001; Scalbert and Williamson, 2000). Ωστόσο, οι φυσικοί αντιοξειδωτικοί μηχανισμοί μπορεί να είναι ανεπαρκείς και η παροχή αντιοξειδωτικών μέσω διατροφικών συστατικών παρουσιάζει μεγάλο ενδιαφέρον. Έτσι, υπάρχει μεγάλο ενδιαφέρον για το φαινολικό περιεχόμενο τόσο της ελιάς όσο και των παραπροϊόντων της (απόβλητα ελαιουργείων). Ολοένα και μεγαλύτερο ποσοστό ερευνών μας δείχνει ότι οι αντιοξειδωτικές ιδιότητες της ελιάς βοηθούν στην πρόληψη τόσο των απλών όσο και των σοβαρών ασθενειών όπως ο καρκίνος (García-Villalba 2012) και άλλες καρδιαγγειακές παθήσεις (Olga Castaner 2011).

Στη συγκεκριμένη ερευνά που έγινε *in vitro* στο εργαστήριο προσδιορίστηκε τόσο η αντιοξειδωτική δράση όσο και η αναγωγική ικανότητα ενθυλακωμένων πολυφαινολικών εκχυλισμάτων από απόβλητα ελαιοτριβείων. Χρησιμοποιήθηκαν δυο πειραματικά πρωτόκολλα από τα οποία με το ένα μελετήσαμε την αντιοξειδωτική δράση των ενθυλακωμένων πολυφαινολικών εκχυλισμάτων απέναντι στην ρίζα DPPH[•] και με το δεύτερο μετρήθηκε η αναγωγική ικανότητα των ιδίων δειγμάτων αποβλήτων.

Με την πρώτη μέθοδο αυτή της ρίζας DPPH[•] τα πολυφαινολικά εκχυλίσματα είχαν όλα μια αναμενόμενη αντιοξειδωτική δράση. Και τα 23 από αυτά είχαν αντιοξειδωτική δράση καθώς όλα εξουδετέρωσαν τη ρίζα DPPH[•]. Αξίζει να σημειωθεί ότι το εύρος των τιμών IC₅₀ που παρατηρηθήκαν στις διαφορές συγκεντρώσεις που χρησιμοποιήθηκαν ήταν από 288 έως και 750 μg/ml. Συγκεκριμένα το δείγμα 15 της μαλτοδεξτρίνης που είχε IC₅₀ όσο με 288 μg/ml ενώ το δείγμα 2 της ζελατίνης είχε IC₅₀ ίσο με 750 μg/ml. Μια άλλη παρατήρηση που μπορούμε να σημειώσουμε είναι ότι γενικά τα δείγματα μαλτοδεξτρίνης και πρωτεΐνης έχουν σημειώσει δράση αντιοξειδωτική μεγαλύτερη από εκείνα της ζελατίνης μια και ο μέσος όρος των IC₅₀ των δειγμάτων πρωτεΐνης και μαλτοδεξτρίνης είναι μεγαλύτερος από αυτών των δειγμάτων της ζελατίνης. Γενικά ο μέσος όρος των IC₅₀ των δειγμάτων πρωτεΐνης, μαλτοδεξτρίνης και ζελατίνης είναι 331 μg/ml 500,72 μg/ml και 505,25 μg/ml αντίστοιχα .

Με την δεύτερη μέθοδο αυτή του προσδιορισμού της αναγωγικής ικανότητας των ιδίων δειγμάτων παρατηρηθήκαν κάποια αξιοσημείωτα αποτελέσματα όσον αφορά ένα μεγάλο αριθμό δειγμάτων. Οι γενικές πληροφορίες που μπορούν να εξαρθούν είναι ότι μιλάμε για ένα εύρος τιμών P.R_{0,5AU} από 434,28 έως και 866,2 μg/ml με φυσικά το μικρότερο αριθμό να μας υποδεικνύει την μεγαλύτερη αναγωγική δράση των δειγμάτων. Το δείγμα με την περισσότερη αναγωγική δράση ήταν αυτό της πρωτεΐνης 2 το οποίο είχε P.R_{0,5AU} όσο με 434,28 μg/ml και αντίστοιχα αυτό με την μικρότερη αναγωγική δράση ήταν αυτό της μαλτοδεξτρίνης 8 με 866,2 μg/ml. Στην συγκεκριμένη μέθοδο δεν μπορούμε να χρησιμοποιήσουμε την προηγούμενη ομαδοποίηση που παρουσιάστηκε στην μέθοδο εξουδετέρωσης της ρίζας DPPH[•] όσον αφορά τα δείγματα πρωτεΐνης μαλτοδεξτρίνης έναντι αυτών της ζελατίνης μιας και εδώ παρουσιάστηκε μια

ιδιομορφία. Όπως είδαμε παραπάνω στην πρώτη μέθοδο όλα τα δείγματα είχαν κάποια δράση έναντι στη ρίζα DPPH και σε ορισμένες περιπτώσεις η δράση αυτή ήταν ισχυρή ακόμα και στα δείγματα της ζελατίνης. Στην μέθοδο προσδιορισμού της αναγωγικής ικανότητας παρατηρήθηκε το έξης φαινόμενο: όλα τα δείγματα της ζελατίνης δεν παρουσίασαν καμιά δράση αναγωγική. Πράγμα το οποίο μπορεί να μας οδηγήσει στο συμπέρασμα ότι από τα τρία εκχυλίσματα των ενθυλακωμένων αυτά της ζελατίνης τελικά ήταν τα λιγότερο δραστικά στις δυο μεθόδους που χρησιμοποιήθηκαν στην συγκεκριμένη μελέτη.

Εν κατακλείδι, τα αποτελέσματα της παρούσας μελέτης έδειξαν ότι η ενθυλάκωση πολυφαινολικών εκχυλισμάτων από απόβλητα ελαιοτριβείου ιδιαίτερα σε πρωτεΐνη τυρογάλακτος και μαλτοδεξτρίνη έχει ως αποτέλεσμα αυτά να διατηρούν σημαντική αντιοξειδωτική και αναγωγική δράση. Δεν συνέβη το ίδιο όμως όταν η ενθυλάκωση είτε σε πρωτεΐνη είτε σε μαλτοδεξτρίνη συνδυάστηκε με ζελατίνη. Αυτός ο συνδυασμός είχε ως αποτέλεσμα να μειωθεί η αντιοξειδωτική δράση του εκχυλίσματος, ενώ δεν υπήρχε καθόλου αναγωγική δράση. Η επιτυχημένη όμως όσον αφορά την αντιοξειδωτική δράση ενθυλάκωση σε πρωτεΐνη και μαλτοδεξτρίνη δείχνει ότι τα υλικά αυτά θα μπορούσαν να χρησιμοποιηθούν ως ενθυλακωτικά μέσα των πολυφαινολικών εκχυλισμάτων από απόβλητα ελαιοτριβείου, έτσι ώστε να αυξηθεί η βιοδιαθεσιμότητα τους σε περίπτωση που θα χρησιμοποιηθούν για την παρασκευή αντιοξειδωτικών διατροφικών συμπληρωμάτων ή βιολειτουργικών τροφίμων.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- Visioli F. & Galli C. (1998) *The effect of minor constituents of olive oil on cardiovascular disease: New findings*. Nutr. Rev. 56, 142-147.
- Andrikopoulos N. K., Kaliora A. C., Assimopoulou A. N., Papageorgiou V. P. (2002) *Inhibitory activity of minor polyphenolic and nonpolyphenolic constituents of olive oil against in vitro low-density lipoprotein oxidation*. Journal of Medicinal Food 5 (No 1) in press.
- Μπαλατσούρας Γ.Δ., Κυριότερες ποικιλίες ελιάς ανά τον κόσμο. Στο: Το Ελαιόδεντρο. Ν. Μαυρομάτης & ΣΙΑ ΕΠΕ (Εκδ). 1984, σελ. 366-370
- Lousser R. and Brousse G. *Techniques Agricoles et Productions Méditerranéennes*. In: L' Olivier. G.P. Maisonneuve and Larose +Olivier. G.P. Maisonneuve and Larose (Eds), 1978.
- Fernandez Diez MJ, Fernandez-Bolanos J, Heredia Moreno A, Rivas Moreno M, Iglecias Guerra F. *Azucars en aceitunas verdes I. Determinacion enzimatica de glucose*. Grasas y Aceites, 1981; 32: 83-85.
- Minguez-Mosquera M.J., Gandul-Rojas B. and Gallardo-Guerrero. *Measurement of Chlorophyllase activity in olive fruit (Olea europaea)*. Journal of Biochemistry, 1994; 116: 263-268.
- Gastillo Gomez J., Minguez-Mosquera M.I. y Fernandez Diez M.J. *Presencia de Poligalacturonasa (PG) en la aceituna negra madura. Factores que influyen la actividad de dicha enzima*. Grasas y Aceites, 1978; 29 (5): 333-338.
- Kiritsakis A. *Deterioration of olive oil*. In: Olive Oil. A.Kiritsakis (Ed.) AOCS PRESS, Champaign, Illinois, 1990; 104-127: 13-15.
- Boskou D. *Olive Oil, Chemistry and Technology*. AOCS PRESS. Campaign, Illinois 1996.
- Mulinacci N., Romani A., Galardi C., Pinelli P., Giaccherini C., Vincieri F.F. *Polyphenolic content in olive oil waste waters and related olive samples*. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2001; 49: 1005-1009.
- Aktas E. S., Imre S. & Ersoy L. (2001) *Characterization and lime treatment of olive mill wastewater*. Water Research 35, 2336-2340.

- Ranalli A. (1991a) *The effluent from olive mills: proposals for re-use and purification with reference to Italian legislation. Part I. Olivae* 37, 30-39.
- Ranalli A. (1991b) *The effluent from olive mills: proposals for re-use and purification with reference to Italian legislation. Part II. Olivae* 38, 26-40.
- Ranalli A. (1991c) *The effluent from olive mills: proposals for re-use and purification with reference to Italian legislation. Part III. Olivae* 39, 18-34.
- Assas N, Ayed L, Marouani L, Hamdi M. Decolorization of fresh and stored black olive mill wastewaters by *Geotrichum candidum*. *Process Biochemistry* 2002; 38: 361-365.
- Assas N., Marouani L. & Hamdi M. (2000) Scale down and optimization of olive mill wastewaters decolorization by *Geotrichum candidum*. *Bioprocess Engineering* 22, 503-507.
- Sayadi S. & Ellouz R. (1992) Decolourization of olive mill wastewaters by the white-rot fungus *Phanerochaete chrysosporium*: involvement of the lignin-degrading system. *Applied Microbiology and Biotechnology* 37, 813-817.
- Robles A., Lucas R., Alvarez de Chienfuegos G. & Galvez A. (2000a) Phenol-oxidase (laccase) activity in strains of the hyphomycete *Chalara paradoxa* isolated from olive mill wastewater disposal ponds. *Enzyme and Microbial Technology* 26, 484-490.
- Paredes C., Cegarra J., Roig A., Sanchez-Monedero M. A. & Bernal M. P. (1999) Characterization of olive mill wastewater (alpechin) and its sludge for agricultural purposes. *Bioresource Technology* 67, 111-115.
- García García I., Pepa J. P. R., Venceslada B. J. L., Martın M. A., Santos M. M. A. & Gómez R. E. (2000) Removal of phenol compounds from olive mill wastewater using *Phanerochaete chrysosporium*, *Aspergillus niger*, *Aspergillus terreus* and *Geotrichum candidum*. *Process Biochemistry* 35, 751-758.
- Hamdi M., BouHamed H. & Ellouz R. (1991) Optimization of the fermentation of olive mill wastewaters by *Aspergillus niger*. *Applied Microbiology and Biotechnology* 36, 285-288.
- Hamdi M. & Ellouz R. (1992) Use of *Aspergillus niger* to improve filtration of olive mill wastewaters. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology* 53, 195-200.
- Sayadi S. & Ellouz R. (1992) Decolourization of olive mill wastewaters by the

white-rot fungus *Phanerochaete chrysosporium*: involvement of the lignin-degrading system. *Applied Microbiology and Biotechnology* 37, 813-817.

- Manimekalai R. & Swaminathan T. (2000) Removal of hazardous compounds by lignin peroxidase from *Phanerochaete chrysosporium*. *Bioprocess Engineering* 22, 29-33.
- Martirani L., Giardina P., Marzullo L. & Sannia G. (1996) Reduction of phenol content and toxicity in olive oil mill waste waters with the ligninolytic fungus *Pleurotus ostreatus*. *Water Research* 30, 1914-1918.
- Scioli C. & Vollaro L. (1997) The use of *Yarrowia lipolytica* to reduce pollution in olive mill wastewaters. *Water Research* 31, 2520-2524.
- Di Gioia D., Fava F., Bertin L. & Marchetti L. (2001a) Biodegradation of synthetic and naturally occurring mixtures of mono-cyclic aromatic compounds present in olive mill wastewaters by two aerobic bacteria. *Applied Microbiology and Biotechnology* 55, 619-626.
- Di Gioia D., Bertin L., Fava F. & Marchetti L. (2001b) Biodegradation of hydroxylated and methoxylated, phenylacetic and phenylpropenoic acids present in olive mill wastewaters by two bacterial strains. *Research Microbiology* 152, 83-93.
- Benitez J., Beltran-Heredia J., Torregrosa J., Acero J. L & Cercas V. (1997b) Aerobic degradation of olive mill wastewaters. *Applied Microbiology and Biotechnology* 47, 185-188.
- Zervakis G., Yiatras P. & Balis C. (1996) Edible mushrooms from olive oil mill wastes. *International Biodeterioration & Biodegradation* 38, 237-243.
- Sánchez Villasclaras S., Martínez Sancho M. E., Espejo Caballero M. T. & Delgado Pérez A. (1996) Production of microalgae from olive mill wastewater. *International Biodeterioration & Biodegradation* 38, 245-247.
- Cabrera F., Lopez R., Martinez-Bord   A., Dupuy de Lome & Murillo J. M. (1996) Land treatment of olive oil mill wastewater. *International Biodeterioration & Biodegradation* 38, 215-225.
- Gonzalez-Lopez J., Pozo C., Martinez-Toledo M. V., Rodelas B. & Salmeron V. (1996) Production of polyhydroxyalkanoates by *Azotobacter chroococcum* H23 in wastewater from olive oil mills (alpechin). *International Biodeterioration & Biodegradation* 38, 271-276.
- Mercad   M. E., Manresa M. A., Robert M., Espuny M. J., de Andr  s C. & Guinea J. (1993) Olive oil mill effluent (oome). New substrate for biosurfactant production. *Bioresource Technology* 43, 1-6.

- Sutherland I. W. (1996) Microbial biopolymers from agricultural products: production and potential. *International Biodeterioration & Biodegradation* 38, 249-261.
- Dew T, Day A, Morgan M, "Xanthine Oxidase Activity in Vitro: Effects of Food Extracts and Components" Department of Food Science, University of Leeds, 2005.
- Brenes M., Romero C., de Castro A. Combined fermentation and evaporation processes for treatment of washwaters from Spanish-style green olive processing. *Journal of Chemical Technology & Biotechnology*, 2004; 79: 253-259(7).
- Marsilio V, Campestre C, Lanza B. Phenolic compounds change during California-style ripe olive processing. *Food Chemistry*, 2001; 74: 55–60.
- Boskou D. *Olive Oil, Chemistry and Technology*. AOCS PRESS. Campaign, Illinois 1996.
- Georgalaki M.D., Sotiroudis T.G. and Xenakis, A. (1998) The presence of Oxidizing Enzyme Activities in Virgin Olive Oil. *Journal of the American Oil Chemists' Society (JAOCS)*, 1998; 75: 155-159.
- Ciafardini G., Marsilio V., Lanza B., Pozzi N. Hydrolysis of oleuropein by *Lactobacillus plantarum* strains associated with olive fermentation. *Applied and Environmental Microbiology*, 1994; 60: 4142-4147.
- Baldioli M, Servili M, Perretti G, Montedoro GF. Antioxidant activity of tocopherols and phenolic compounds of virgin olive oil. *Journal of the American Oil Chemists' Society (JAOCS)*, 1996; 73: 1589-1593.
- Brenes M, Garcia A, Garcia P, Rios JJ, Garrido A. Phenolic compounds in Spanish olive oils. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 1999; 47: 3535-3540.
- Le Tutour B, Guedon D. Antioxidative activities of *Olea europaea* leaves and related phenolic compounds. *Phytochemistry*, 1992; 31: 1173-1178.
- Juven B. and Y. Henis. Studies on the antimicrobial activity of olive phenolic compounds. *Journal of Applied Bacteriology* 1970; 33: 721-732.
- Paster N., Juven BJ, Harshemesh H. Antimicrobial activity and inhibition of aflatoxin B I formation by olive plant tissue constituents, *Journal of Applied Bacteriology*, 1988; 64: 293-297.
- Fleming HP, Walter WM, Etchells JL. Antimicrobial properties of oleuropein

and products of its hydrolysis. *Journal of Applied Microbiology*, 1973; 26 (5): 777—782.

- Fleming HP, Walter WM, Etchells JL. Isolation of a bacterial inhibitor from green olives. *Journal of Applied Microbiology*, 1969; 18: 856—860.
- Garrido-Fernandez A, Vaughn RH. Utilization of oleuropein by microorganisms associated with olive fermentations. *Canadian Journal of Microbiology*, 1978; 24(6): 680—684.
- Gourama H. and Bullerman L.B. Effects of oleuropein on growth and aflatoxin production by *Aspergillus parasiticus*. Dept. Food Science & Technology, University of Nebraska, Lincoln, 1987.
- Vasquez Roncero A, Graciani Constante E, Maestroduran R. *Grasas y Aceites*, 1974, p.269—279.
- Tassou C., Nychas G. J. E. 1995. Inhibition of *Salmonella enteritidis* by oleuropein in broth and in a model food system. *Letters in Applied*
- Tsimidou, M., Papadopoulos, G., Boskou, D. “Phenolic compounds and stability of virgin olive oil”. 1992 *Food Chemistry* 45 (2) , pp. 141-144.
- Niaounakis, M., Halvadakis C.P., “Olive Processing Waste Management”. 2006. *Literature Review and Patent Survey, Second Edition*, Elsevier
- Baydar, N. G., Ozkan, G., & Sagdic, O. “Total phenolic contents and antibacterial activities of grape (*Vitis vinifera* L.)”. 2004. *Food Chemistry*, 15, 335–339.
- Blevé, M., Ciurlia, L., Erroi, E., Lionetto, G., Longoc, L., Rescioa, L. “An innovative method for the purification of anthocyanins from grape skin extracts by using liquid and sub-critical carbon dioxide. 2008. *Separation and Purification Technology*, 64, 192–197.
- Palma, M., & Taylor, L. T. “Extraction of polyphenolic compounds from grape seeds with near critical carbon dioxide”. 1999. *Journal of Chromatography A*, 849, 117–124.
- Mekki, A., Dhouib, A., Sayadi, S. “Polyphenols dynamics and phytotoxicity in a soil amended by olive mill wastewaters”. 2007. *Journal of Environmental Management* 84 (2) , pp. 134-140.
- Corrales, M., Fernandez Garcva, A., Butz, P., & Tauscher, B. “Extraction of anthocyanins from grape skins assisted by high hydrostatic pressure”. 2009. *Journal of Food Engineering*, 90, 415–421.

